

ELISPOT-menetelmän testaaminen primaaristen immuunivajavuustilojen diagnosointiin

Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto
Bioanalytiikan koulutusohjelma		
Tekijä/Tekijät		
Kati Ruismäki		
Työn nimi		
ELISPOT-menetelmän testaaminen primäärysten immuunivajavuustilojen diagnosoointiin		
Työn laji	Aika	Sivumäärä
Opinnäytetyö	Kevät 2008	35 + LIITTEET 4
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p>Primaarisilla immuunivajavuustiloilla tarkoitetaan ryhmää sairauksia, jotka johtuvat immuunijärjestelmän solujen sisäisestä häiriöstä. Primaarisessa immuunivajavuustilassa kyseessä on synnynnäinen puutos immuunijärjestelmässä geneettisen häiriön pohjalta. ELISPOT (Enzyme linked immunospot) -menetelmässä T-lymfosyyttejä stimuloidaan spesifisillä antigeeneillä. Stimuloidut solut alkavat tuottaa sytokiinia ja yksittäisten sytokiinia tuottavien solujen määrä voidaan mitata.</p> <p>Tutkimukseni tarkoituksena oli primaaristen immuunivajavuustilojen diagnostiikkaan soveltuvan ELISPOT-menetelmän alustava pystyttäminen ja testaaminen. Tavoitteena oli tutkia, vaikuttaako solujen pakastaminen ELISPOTin antamiin tuloksiin ja voisiko ELISPOT-menetelmässä käyttää pakastettuja soluja alustavien viitearvojen määrittämiseen. Tutkittiin myös yhden ja kolmen vuorokauden inkubaatioajan vaikutusta solujen sytokiinintuotantoon sekä optimaalisia mitogeenikonsentraatioita.</p> <p>Tuoreiden ja pakastettujen näytteiden vertailu tehtiin kolmella henkilökunnan näytteellä. Henkilöistä kerättyjen ja eristettyjen tuoreiden mononukleaarisolujen antamia tuloksia verrattiin samoista henkilöistä aikaisemmin kerättyjen ja pakastettujen solujen antamiin tuloksiin. Viitearvojen alustava määrittäminen tehtiin pakastetuista potilasnäytteistä. Mitogeenikonsentraatioiden titraaminen ja inkubaatioaikojen vertailu tehtiin henkilökunnan tuoreista näytteistä.</p> <p>Tulokset osoittivat, että tuoreiden ja pakastettujen solujen sytokiinintuotanto eroaa toisistaan ja pakastettuja soluja ei voi käyttää viitearvojen määrittämiseen tässä menetelmässä. Inkubaatioajavertailu osoitti, että yhden vuorokauden inkubaatioaika antoi riittävästi spotteja, mutta kolmen vuorokauden inkubaatioaika lisäsi solujen sytokiinintuotantoa niin paljon, että tuloksia oli vaikea tulkita. Mitogeenikonsentraatioita titraamalla saatiin selville Con A-mitogeenin optimaalinen ja suboptimaalinen pitoisuus ELISPOT-menetelmää varten. PWM:lla ja PHA:lla titrauksia tulee vielä jatkaa optimaalisen konsentraation selvittämiseksi. Näille mitogeeneille käytetty solumäärä 200 000 solua/kuoppa oli liian suuri ja spotteja tuli liikaa, jotta niitä olisi voitu lukea.</p> <p>Mitogeenien konsentraatioiden titraamista kannattaa tutkia lisää. Lisäksi tulevaisuudessa kannattaa alustavien viitearvojen määrittäminen tehdä tuoreista soluista. Solumääriä kannattaa tulevaisuudessa myös titrata, jotta ELISPOT-menetelmälle parhaiten soveltuva solumäärä löytyisi.</p>		
Avainsanat		
primaarinen immuunivajavuustila, ELISPOT, pakastaminen, viitearvot, mitogeenit		

Degree Programme in		Degree	
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care	
Author/Authors			
Kati Ruismäki			
Title			
ELISPOT Assay for Primary Immunodeficiency Diagnostics			
Type of Work	Date	Pages	
Final Project	Spring 2008	35 + 4 appendices	
<p>ABSTRACT</p> <p>Primary immunodeficiencies are a group of disorders in which the body's immune system is missing or isn't functioning properly. The primary immunodeficiency diseases are caused by genetic defects in the immune system. In an enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay T lymphocytes are stimulated with specific antigens and the level of cytokine produced by individual cells can be measured.</p> <p>The purpose of this study was to set up and test an ELISPOT assay for use in primary immunodeficiency diagnostics. The objective was to study if cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) had an effect on results obtained with ELISPOT assays and if the cryopreserved samples could be used to determine preliminary reference values. Also the effect of 1 day and 3 days incubation periods to cytokine production of the PBMC were studied.</p> <p>Three healthy donors were selected for the comparison between freshly isolated and cryopreserved PBMC. Results from the freshly isolated PBMC and cryopreserved cells were compared for each donor. The determination of reference values was executed with cryopreserved cells. The incubation time comparison and mitogen concentration titration was executed with freshly isolated cells.</p> <p>The results showed that there were differences with the cytokine production of freshly isolated and cryopreserved PBMC using the ELISPOT assay and thus the usage of cryopreserved cells is not recommended. The comparison of incubation periods showed that after 1 day incubation the cytokine production of PBMC was at a sufficient level to be measured with the ELISPOT assay. After three days the cytokine production was at such a high level that it was impossible to count the number of spots produced. In the mitogen concentration titration the optimal and suboptimal concentration level of Con A mitogen was obtained. For PWM and PHA mitogens the number of cells used was too high (200000 / well) and the number of spots produced in ELISPOT assays was too high to be calculated.</p> <p>The results indicate that the titration of mitogen concentrations should be continued to find out the correct level for ELISPOT assay. Also the optimal number of PBMC / well for the ELISPOT assay should be titrated. In the future it is advisable to use freshly isolated PBMC for determining the reference values for the ELISPOT instead of cryopreserved PBMC.</p>			
Keywords			
primary immunodeficiency, ELISPOT, cryopreservation, reference values, mitogens			

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	IMMUUNIVASTEEN KULKU	3
2.1	Luonnollinen ja opittu immuniteetti	3
2.2	T-solun ja antigeenin kohtaaminen ja MHC-luokat	4
2.3	T-soluluokat (CD4-positiiviset ja CD8-positiiviset)	5
3	PRIMAARISET IMMUUNIVAJAVUUSTILAT JA NIIDEN DIAGNOSTIIKKA	7
3.1	Primaariset immuunivajavuustilat	7
3.2	Immuunivajavuustilojen diagnostiikka	8
3.2.1	Lymfosyytti-proliferaatiotesti	8
3.2.2	ELISPOT-menetelmä	9
3.2.3	Käytetyt mitogeenit	10
4	PAKASTAMISEN VAIKUTUS MONOKLONAALISIIN LYMFOSYYTTEIHIN	11
5	VIITEARVOT	12
5.1	Viitearvojen määritelmä	12
5.2	Viitearvojen määrittäminen	13
6	TYÖN TARKOITUS	14
7	TYÖN TOTEUTTAMINEN	14
7.1	Tutkimusaineisto ja eettinen pohdinta	15
7.2	Pakastettujen solujen sulatus ja eristys	16
7.3	Tuoreiden solujen eristys	17
7.4	IFN- γ ELISPOTin suoritus	17
7.4.1	Levyn esivalmistelu (blokkauk)	17
7.4.2	Solujen stimuloiminen	18
7.4.3	Vasta-ainekonjugaatin ja Streptavidiinin lisääminen	19
7.4.4	Substraatin lisääminen	19
7.5	Pakastettujen ja tuoreiden näytteiden vertailu	20
7.6	Pakastettujen solujen analyysi mahdollisten viitearvojen laskentaa varten	20
7.7	Mitogeenien titraus	20
7.8	Inkubaatioajan vertailu	21
7.9	Tulosten analysointi	21
8	TYÖN TULOKSET	22
8.1	Pakastettujen ja tuoreiden näytteiden vertailu	22
8.2	Viitearvojen määrittäminen pakastetuista potilasnäytteistä	24
8.3	Mitogeenien laimennossarjat	25
8.4	Inkubaatioajan vaikutus sytokiinin tuotantoon	27
9	LUOTETTAVUUS	29
10	JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA	30
	LÄHTEET	32
	LIITTEET 1-4	

1 JOHDANTO

Primaarisilla immuunivajavuustiloilla tarkoitetaan ryhmää sairauksia, jotka johtuvat immuunijärjestelmän solujen sisäisestä häiriöstä ja ne ovat usein perinnöllisiä. Primaarissa immuunivajavuustilassa kyseessä on synnynnäinen puutos immuunijärjestelmässä geneettisen häiriön pohjalta. (Ruuskanen – Jalanko 2005: 797.) Immuunipuutospotilaila, joilla häiriö kohdistuu soluvälitteisen immuniteetin osaan, esimerkiksi T-soluihin, infektoita aiheuttavat ympäristössämme olevat tavalliset mikrobit. Näitä mikrobeja vastaan elimistö pystyy normaalisti puolustautumaan. (Roitt – Brostoff – Male 2001: 303.)

HUSLABin immunologian osastolla on kiinnostuttu selvittämään, voisiko ELISPOT-menetelmää käyttää primaarisen immuunivajavuustilan diagnostiikassa. Tällä hetkellä HUSLABin transplantaatiolaboratoriossa käytetään immuunivajavuustilojen diagnosointiin radioaktiivista lymfosyytti-proliferaatio-menetelmää, jossa lymfosyyttejä stimuloidaan erilaisilla mitogeeneilla. Stimuloitujen solujen jakautumista tutkitaan mittaamalla DNA-synteesiä ^3H -tymidiini-inkorporaatiolla. ELISPOT-menetelmässä hyötynä olisi radioaktiivisuudesta eroon pääseminen.

ELISPOT (Enzyme linked immunospot) -menetelmä kehitettiin 1980-luvulla. ELISPOT-menetelmässä T-lymfosyyttejä stimuloidaan spesifisillä antigeeneilla. Antigeeneilla stimuloitunut solu alkaa tuottaa sytokiinia ja yksittäisten sytokiinia tuottavien solujen määrä voidaan mitata. (Czerkinsky – Nilsson – Nygren – Ouchterlony – Tarkowski 1983: 109; Power ym. 1999: 99.) ELISPOT-menetelmää käytetään tällä hetkellä HUSLABissa tuberkuloosin rutiinidiagnostiikassa.

Työni tarkoituksena on ELISPOT-menetelmän kehittäminen primaaria immuunipuutosdiagnoosi varten. Opinnäytetyöni empiirisen osuuden suoritan HUSLABin immunologian laboratoriossa keväällä 2008. Työni tavoitteena on testata, soveltuvatko pakastetut solut alustavien viitearvojen määrittämiseen ja tutkia toimivatko näytteinä käytettävät pakastetut solut samalla tavoin kuin tuoreet solut vai eroavatko niiden antamat tulokset toisistaan. Lisäksi tavoitteena on analysoida pakastettuja näytteitä niin, että

saataisiin alustavat viitearvot. Koska primaarista immuunipuutosdiagnostiikkaa ELISPOT-menetelmällä ollaan vasta kehittämässä, on tavoitteena myös tutkia pidemmän inkubaatioajan vaikutuksia solujen sytokiinin tuotantoon sekä testata erilaisia mitogeenilaimennuksia optimaalisen mitogeenikonsentraation löytämiseksi.

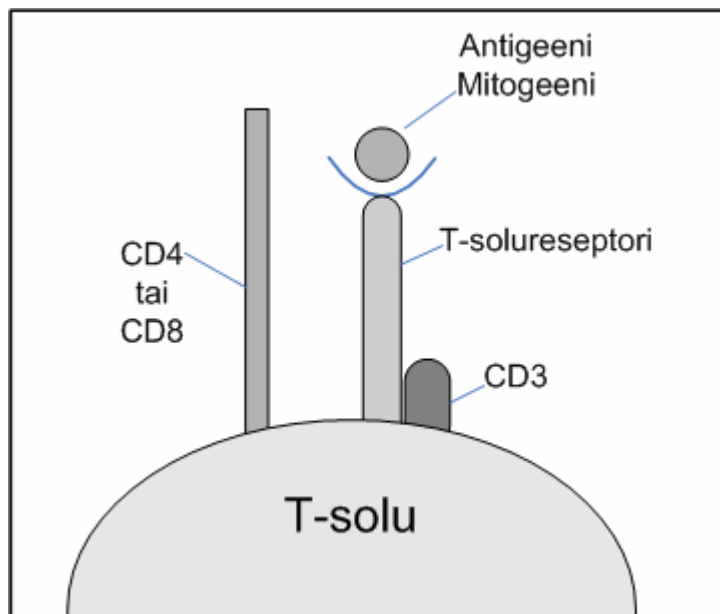
2 IMMUUNIVASTEEN KULKU

2.1 Luonnollinen ja opittu immunitetti

Ihmisen immuunivaste voidaan jakaa luonnolliseen (innate) ja opittuun (adaptive) immuunivasteeseen. Luonnolliselle immunitetille on tyypillistä, että sen reagointi tapahtuu nopeasti ja reaktiot toistuvat joka kerta samanlaisina, vaikka sama patogeeni olisi kohdattu aikaisemminkin, sillä kohteista ei jää muistijälkeä. Luonnollisen puolustuksen molekyyleillä on vain rajallinen kyky tunnistaa kohderakenteita. Luonnolliseen immunitettiin kuuluvia osia ovat kudosten yleispuolustusmekanismit: komplementti, makrofagit, mast-solut, NK-solut sekä näiden tuottamat välittäjäaineet. (Meri 2005: 619.)

Luonnollisen immuunivasteen vastakohtana on opittu eli hankittu immuunivaste. Siinä missä luonnollisen immuunivasteen reaktiot toistuvat aikaisemmin kohdatun patogeenin kohdalla joka kerta samanlaisina, opitun immuunivasteen reaktiot pystyvät kehittymään ja nopeutumaan. Opittu immuunivaste perustuu B- ja T-lymfosyyttien toimintaan ja niiden kykyyn tunnistaa vieraita rakenteita. (Meri 2005: 619–620.) B-solut osallistuvat immuunipuolustukseen tuottamalla vasta-aineita eli immunoglobuliineja. Immunoglobuliinit kykenevät tarttumaan spesifisesti antigeeniinsa, mutta ne eivät yleensä kykene aktivoitumaan ilman auttaja-T-solujen vaikutusta. (Seppälä 2005: 699–703.)

T-solujen tärkeimmät tehtävät immuunipuolustuksessa ovat immuunivasteen säätely (T-auttaja) ja infektoituneiden solujen tuhoaminen (T-tappaja). T-soluilla on pinnallaan spesifisiä T-solureseptoreja (TCR, T Cell Receptor), jotka tunnistavat tietyn antigeenin. Eri T-solujen pinnalla on erilaisia reseptoreja, joten T-solut kykenevät yhdessä tunnistamaan suuren määrän eri antigeeneja. T-solureseptoriin on liittyneenä CD3-molekyyli, joka on useammasta proteiinista koostuva kompleks (kuvio 1). CD3-kompleksin tehtävänä on välittää tieto antigeenin tunnistamisesta solun sisälle ja käynnistää aktivaatioon johtavat signaalintiet solun sisällä. (Arstila – Hänninen 2005: 709–711.)



KUVIO 1. Antigeenit ja mitogeenit stimuloivat T-soluja sitoutumalla solukalvon TCR-CD3-kompleksiin.

Antigeenin tunnistaminen käynnistää solussa tapahtumaketjun, joka johtaa sen aktivoitumiseen. Aktivoituneet solut aloittavat jakaantumisen, jonka tuloksena kyseiselle antigeenille spesifit solut lisääntyvät nopeasti. T-solujen aktivaatio tapahtuu elimistön kohdatessa antigeenin ensimmäistä kertaa eli ns. primaarivasteessa. Primaarinen immuunivaste syntyy perifeerisissä imukudoksissa, joita ovat imusolmukkeet, perna ja limakalvojen imukudokset. Vasta aktivaation jälkeen T-solut vaeltavat infektiopaikalle osallistua puolustukseen. (Arstila ym. 2005: 709–710.)

T-soluvaste hidastuu ja loppuu, kun infektio paranee ja antigeenin määrä vähenee. Tällöin suurin osa aktivoituneista soluista kuolee. Jäljelle jääneet solut muodostavat alkuperäistä solupopulaatiota suuremman antigeenispesifisen joukon, joka toimii T-solumuistina. Jos sama antigeeni kohdataan myöhemmin uudelleen, on vaste muistisolujen ansiosta nopeampi ja tehokkaampi kuin ensimmäisellä kerralla. (Arstila ym. 2005: 709–710.)

2.2 T-solun ja antigeenin kohtaaminen ja MHC-luokat

Kun antigeeni saapuu elimistöön, T-solun on tunnistettava se. T-solureseptori tunnistaa antigeenin vain suorassa solujen välisessä kontaktissa, kun antigeeni on antigeenia esittelevien solujen (APC, antigen presenting cell) pinnalla kiinnittyneenä erityiseen pinta-proteiiniin: MHC-molekyylisiin (Major Histocompatibility Complex). Ihmisen MHC-

molekyylejä kutsutaan HL-antigeeneiksi (HLA, human leucocyte antigen). APC-soluja ovat: dendriittisolut, monosyytti-makrofagilinjan solut sekä B-solut. (Arstila ym. 2005: 713–717.)

MHC-molekyylit jaetaan kahteen luokkaan, jotka ovat rakenteeltaan samankaltaisia. Molemmissa on kahden uloimmaisen domeenin muodostama kolo, jonka sisälle anti-geeni sitoutuu. Toiminnaltaan MHC-molekyyliluokat kuitenkin eroavat toisistaan. Luokan MHC-I molekyylejä on kaikkien tumallisten solujen pinnalla ja niiden esittelemiä antigeeneja tunnistavat sytotoksiset, CD-8 positiiviset T-solut. MHC-I-molekyyleihin sitoutuvat peptidit saavat alkunsa solun omasta proteiinisynteesikoneistosta, solulimasta. Soluliman soluelimet, joita kutsutaan proteasomeiksi, hajottavat proteiineja peptideiksi, jotka lopulta kulkeutuvat solun pinnalle. Terveessä solussa peptidit ovat peräisin solun omista proteiineista, viruksen infektoimissa soluissa viruksesta. Siten luokan MHC-I-molekyylit viestittävät T-soluille solunsisäisestä infektiosta, mikä johtaa infektioituneen solun tappoon. (Arstila ym. 2005: 713–720.)

Luokan MHC-II molekyylejä on vain tiettyjen immuunijärjestelmän solujen pinnalla ja ne esittelevät antigeeneja CD4-positiivisille auttaja-T-soluille. Nämä antigeenit eivät ole merkkejä solunsisäisestä infektiosta, vaan ne ovat peräisin rakenteista, joita solu on ottanut ulkopuolelta sisäänsä esim. fagosytoosilla. (Arstila ym. 2005: 713–720.)

2.3 T-soluluokat (CD4-positiiviset ja CD8-positiiviset)

Aktivoiduttuaan T-solut alkavat jakaantua ja jakaantumisen myötä erilaistua. T-solut voidaan jakaa kahteen alaluokkaan: CD4-positiivisiin T-auttaja-soluihin (Th-solut, T-helper) ja CD8-positiivisiin tappaja-T-soluihin. T-auttaja-solut ilmentävät CD4-molekyylä ja ovat immuunivasteen tärkeitä säätelijäsoluja. T-auttaja-solut erilaistuvat joko Th1- tai Th2-soluiksi riippuen antigeenin luonteesta ja määrästä, sytokiiniympäristöstä ja tarjolla olevasta kostimulaatiosta. Erot Th1- ja Th2-solujen välillä ovat niiden tuottamissa sytokiineissa. Painottuuko immuunivaste soluvälitteiseen vai vasta-ainevälitteiseen immunitettiin riippuu paljolti siitä, kumpaan alaluokkaan CD4-positiiviset T-solut erilaistuvat. (Arstila ym. 2005: 721–723.)

Th1-solujen tehtävänä on aktivoida makrofageja tuottamiensa sytokiininien (IFN- γ , TNF- α ja TNF- β) sekä tiettyjen pintareseptorien välityksellä, jotta makrofagit voisivat paremmin tappaa fagosytoimansa mikro-organismit. Lisäksi Th1-solut aktivoivat toisinaan CD8-positiivisia T-soluja. Th2-solut auttavat B-soluja ja siten vasta-ainetuotantoa. Niiden tuottamia sytokiineja ovat mm. IL-4 ja IL-5, jotka ovat B-solujen kasvutekijöitä. (Arstila ym. 2005: 721–723.)

T-tappaja-solut ilmentävät CD8-molekyyliä. Jotta T-solut tunnistaisivat spesifisen antigeenisen peptidin, täytyy kohdesolun pinnalla olla tätä antigeenia MHC-I-luokan molekyyliin sitoutuneena. CD8-positiivisten T-solujen aktivointi ja erilaistuminen sytotoksiksi T-soluiksi edellyttää antigeenin esittelyä edeltä käsin tavallisesti dendriittisolun pinnalla, sillä useimmat kohdesolut eivät pysty niitä itsessään aktivoimaan. Sytotoksisten T-solujen kohdesoluina ovat tavallisesti viruksen infektoimat solut. Aktivoiduttuaan CD8-T-solut tappavat infektoituneen kohdesolun. Suojaava immunitetti virustauteja vastaan on usein riippuvainen CD8-positiivisten T-solujen toiminnasta. CD8-positiivisten T-solujen tuottamia sytokiineja ovat IFN- γ ja TNF- α . (Arstila ym. 2005: 721–723.)

Sytokiinit ovat solujen tuottamia, liukoisia valkuaisaineita ja ne aktivoivat kohdesoluja spesifin sytokiinireseptorin kautta. Sytokiinit syntyvät ja vaikuttavat paikallisesti ja ne ovat osa solunulkoista signaalijärjestelmää, joka vaikuttaa sekä luonnolliseen että hankittuun immunitettiin. Sytokiininien tehtävänä on säädellä solujen kasvua ja erilaistumista, stimuloida tai vaimentaa tulehdusreaktioita sekä säädellä yhdessä APC-solujen kanssa antimikrobisen immunitetin kehittymistä. (Julkunen – Silvennoinen – Hurme 2005: 735; Roitt ym. 2001: 119.)

Interferonit (IFN) ovat sytokiiniyryhmä, jonka tehtävänä on hidastaa ja estää virusten ja muiden solunsisäisten mikrobien lisääntymistä. Interferoni-gamma (IFN- γ) kuuluu tyyppin II interferoneihin ja sitä tuottavat vain NK- ja T-solut. IFN- γ tuotanto stimuloituu antigeenia esittelevien solujen ja lymfosyyttien välisessä yhteisvaikutuksessa. Myös Th1-solujen tuottamat sytokiinit (esim. IL-12 ja IL-18) ja niiden yhteisvaikutukset voivat stimuloida IFN- γ -tuotantoa. IFN- γ lisää makrofagien aktivaatiota sekä kudosaantigeenien ilmentymistä ja parantaa näin solujen antigeenin esittelykykyä. Lisäksi se estää Th2-tyyppisten solujen jakaantumista. (Julkunen ym. 2005: 738–739.)

3 PRIMAARISET IMMUUNIVAJAVUUSTILAT JA NIIDEN DIAGNOSTIIKKA

3.1 Primaariset immuunivajavuustilat

Immuunivajavuustiloilla tarkoitetaan ryhmää sairauksia, joissa elimistön kyky vastustaa infektioita on heikentynyt yhden tai useamman immuunivasteen osan toimintahäiriön vuoksi. Immuunivajavuustilat voidaan jakaa sekundaarisiin ja primaarisiin. Sekundaarisessa immuunivajavuustilassa immuunijärjestelmä toimii puutteellisesti ilman periytynyttä geenivirhettä. Sekundaariset immuunivajavuustilat liittyvät yleensä maailmanlaajuisesti aliravitsemukseen, HIV-infektioon ja tuhkarokkoon ja länsimaissa usein syövän, elinsiirtojen ja autoimmuunisairauksien hoitoon. Primaarisessa immuunivajavuustilassa jossakin immuunijärjestelmän osassa on synnynnäinen puutos geneettisen häiriön vuoksi. (Ruuskanen – Jalanko 2005: 797; Seppänen – Repo 2005: 805.) Primaariset immuunivajavuustilat voidaan karkeasti jakaa viiteen luokkaan: B-soluvajavuudet, T-soluvajavuudet, yhdistyneet immuunivajavuudet, fagosytoivien solujen vajavuudet sekä komplementin vajavuudet (Buckley 2002: 747).

Primaarinen immuunivajavuustila johtuu immuunijärjestelmän solujen sisäisestä häiriöstä ja on usein periytyvä. Immuunivajavuustilat aiheuttavat potilaille toistuvia infektiota ja muita kliinisiä ongelmia, jotka ovat vakavampia kuin sekundaarisissa vajavuustiloissa. Immuunipuutospotilailla tavatut infektiot voidaan karkeasti jakaa kahteen luokkaan. Häiriöt immunoglobuliineissa, komplementin proteiineissa tai fagosyyteissä altistavat toistuville pyogeenisille infektioille. Immuunipuutospotilaat, joilla häiriö kohdistuu soluvälitteiseen immuniteettiin (esimerkiksi T-soluihin), ovat alttiita solunsisäisille viruksille ja bakteereille, joita vastaan terveen ihmisen elimistö pystyy puolustautumaan ja kehittämään vastustuskyvyn. (Buckley 2002: 747; Roitt ym. 2001: 303.)

T-solujen häiriöt voivat johtaa monenlaisiin immuunivajavuustiloihin, sillä T-solut säätelevät immuunivasteen osia (Ruuskanen ym. 2005: 798). Potilaat, joilla ei ole T-soluja tai joiden T-solujen toiminta on häiriintynyt, ovat alttiita opportunistisille infektioille. T-soluvajavuudet vaikuttavat myös vasta-ainevälitteiseen immuniteettiin, sillä B-solujen

toiminta ihmisen elimistössä on vahvasti riippuvainen T-soluista. (Roitt ym. 2001: 305–306.)

3.2 Immuunivajavuustilojen diagnostiikka

Epäiltäessä T-soluvajavuutta yksinkertainen seulontatutkimus on veren imusolujen määrän tutkiminen, sillä vakavissa soluvälitteisen immuunipuolustuksen puutostiloissa esiintyy usein lymfositopeniaa. Kaikissa soluvälitteisen immuunipuolustuksen puutostiloissa lymfositopeniaa ei kuitenkaan esiinny ja yksityiskohtaisempi analyysi, kuten tiettyjen soluluokkien määrittäminen, niiden fenotyypitys ja imusolujen toiminnan arviointi, ovat tarpeen. Lymfosyyttien toimintaa voidaan määrittää in vitro eristämällä mononukleaariset lymfosyytit potilaan verinäytteestä ja inkuboimalla niitä antigeenin tai mitogeenin kanssa. Inkubointi mitogeenin kanssa johtaa lymfosyyttien jakaantumiseen. (Folds – Schmitz 2003: 702,705–706; Ruuskanen ym. 2005: 802.)

HUSLABin transplantaatiolaboratoriossa käytetään tällä hetkellä immuunipuutostilojen diagnosointiin lymfosyytti-proliferaatiotestiä. Käytössä oleva lymfosyytti-proliferaatiotesti on akkreditoitu ja auditoitu yhteneväiseksi Turun yliopistollisen keskussairaalan metodin kanssa. (Räisänen-Sokolowski 2008.)

3.2.1 Lymfosyytti-proliferaatiotesti

Lymfosyytti-proliferaatiomääritys on standardoitu laboratoriotesti lymfosyyttien toiminnan tutkimiseen. Lymfosyytti-proliferaatiolla mitataan lymfosyyttien kykyä jakautua vasteena erilaisille stimulantteille. (Folds ym. 2003: 707.) Viimeisen 30 vuoden ajan lymfosyytti-proliferaatiomääritys on ollut pääasiallinen menetelmä antigeenilla stimuloitujen T-solujen jakaantumisen tutkimiseen (Mannering ym. 2003: 173). Määritystä varten tuoreesta verinäytteestä eristetään mononukleaariset solut Ficoll-Paque sentrifugaatiolla. Lymfosyytit aktivoidaan käyttäen phytohemagglutiniini (PHA), Concanavalin A (Con A) ja Pokeweed mitogen (PWM) mitogeeneja. Mitogeeneista tehdään laimennossarjat. Taustakontrollina käytetään 10 % FCS/ RPMI -viljelymediaa. (Veren lymfosyyttien stimulaatiotutkimus 2007.)

Kutakin mitogeenilaimennosta sekä taustakontrollia pipetoidaan kuoppalevyille, jonka jälkeen kunkin mitogeenilaimennoksen ja taustakontrollin kuoppiin pipetoidaan solususpensiota. Kuoppalevyjä inkuboidaan 37° C lämpökaapissa 5 % hiilidioksidilämpötilassa kolmen vuorokauden ajan. Stimuloitujen solujen jakautumista tutkitaan mittaamalla DNA-synteesiä kolmen vuorokauden viljelyn jälkeen ³H-tymidiini-inkorporaatiolla. Inkorporaation määrä on suoraan verrannollinen DNA:ta syntetisoivien solujen lukumäärään. Tulokset lasketaan nestetuikelaskijalla, joka ilmoittaa tulokset tuikkeina minuutissa (counts per minute, cpm). Potilasnäytteiden tuloksia verrataan terveiden henkilöiden tuloksiin. (Veren lymfosyyttien stimulaatiotutkimus 2007; Manning ym. 2003: 173.)

3.2.2 ELISPOT-menetelmä

T-solut tuottavat sytokiineja, jotka liittyvät monin eri tavoin immuunivasteeseen. Määrittämällä antigeenin stimuloimaa sytokiinin tuotantoa yksittäisen solun tasolla, voidaan todeta ja tunnistaa antigeenispesifisiä CD4- tai CD8-soluja. (Folds ym. 2003: 708.) ELISPOT (enzyme linked immunospot) on herkkä menetelmä, jolla voidaan havaita sytokiinin eritystä yksittäisen solun tasolla. ELISPOT-menetelmän avulla voidaan määrittää yksittäisten sytokiinia, tässä tapauksessa interferoni-gammaa, erittävien solujen määrä suuresta solupopulaatiosta. Stimulantteina käytetään antigeeneja tai mitogeneja. (Czerkinsky ym. 1983: 114; Mabtech Ab 2008.)

ELISPOT-menetelmässä kuoppalevyn pohjalla olevaan polyvinyyliidifluoridi (PVDF) -kalvoon on kiinnitetty IFN- γ -vasta-aine. Eristettyjä mononuklearisoluja ja stimulantteina käytettäviä antigeeneja inkuboidaan yhden vuorokauden ajan. Jos näytteessä on antigeenispesifisiä T-soluja, ne tuottavat interferoni-gammaa, joka sitoutuu kuopan pohjalla oleviin IFN- γ -vasta-aineisiin. Kun solut on pesty pois, kuoppaan lisätään sekundääri-vasta-aine 7-B6-1-biotin. Kuoppalevyn annetaan inkuboitua, jonka jälkeen se pestään. Seuraavaksi kuoppaan lisätään Streptavidin-ALP (ALP, alkaalinen fosfataasi), johon sekundääri-vasta-aine kiinnittyy. Inkubaation ja pesun jälkeen lisätään substraatti BCIP/NBT-plus. Substraatti värjää kohdat joihin IFN- γ on kiinnittynyt ja muodostaa näkyvät väritäplät eli spotit (liite 1). Spotit voidaan laskea mikroskoopin tai ELISPOT-lukijan avulla. Yksi spotti vastaa yhtä reaktiivista lymfosyyttiä. (Folds ym. 2003: 708; Mabtech Ab 2008.)

Käytettävät mitogeenit ovat samoja, joita transplantaatiolaboratorio käyttää eli PHA, Con A sekä PWM. Con A:sta käytetään laimennoksia, joissa mitogeenin pitoisuus kuoppaa kohden on 2,5 µg/ml ja 5 µg/ml. PHA:sta käytettiin laimennoksia, joissa mitogeenin pitoisuus kuoppaa kohden on 2,5 µg/ml ja 10 µg/ml. PWM-mitogeenista käytetään kuoppaa kohden laimennosta 2,5 µg/ml. Mitogeenien pitoisuudet ilmoitetaan tästä lähin tekstissä pitoisuutena kuoppaa kohden, ellei erikseen mainita toisin. Lisäksi mitogeeneista käytettiin tutkimuksessa näitä pitoisuuksia, ellei toisin mainita. Lisäksi spesifisempinä stimulaattoreina käytetään monoklonaalista anti-CD3-vasta-ainetta sekä virus-peptidiseosta (CEF), joka sisältää peptidejä sytomegalovirukselta, Epstein-Barr-virukselta ja influenssa-virukselta.

3.2.3 Käytetyt mitogeenit

Mitogeenit ovat kemiallisia yhdisteitä, jotka stimuloivat soluja jakaantumaan. Mitogeeneilla voidaan stimuloida soluja epäspesifisesti niiden antigeenispesifisyydestä riippumatta ja saada ne tuottamaan sytokiinia. Toiset mitogeenit stimuloivat sekä T- että B-soluja (esim. PWM) ja toiset vain B-soluja (esim. *Escherichia coli* endotoksiini). (Lääketieteen termit 2002: 176; Folds ym. 2003:705; Hay – Westwood 2002: 277–278.) Antigeenispesifisten T-lymfosyyttien sytokiinin tuotantoa voidaan tutkia stimuloimalla soluja esimerkiksi CEF-peptidiseoksen avulla.

PHA (phytohemagglutiniini), Con A (concanavalin A) ja PWM (pokeweed mitogeeni) ovat lektiinejä, jotka stimuloivat lymfosyyttejä niiden antigeenispesifisyydestä riippumatta ja saavat ne jakautumaan. Lektiniit ovat proteiineja, joita esiintyy mm. kasvien siemenissä. PHA ja Con A ovat lektiinejä, jotka on saatu pavuista ja ne stimuloivat vain T-soluja. (Lääketieteen termit 2002: 176.) PHA ja Con A stimuloivat T-soluja sitoutumalla voimakkaasti solukalvon glykoproteiineihin, kuten TCR-CD3-kompleksiin, mikä useissa soluissa johtaa solun jakautumiseen (Kay 1991: 51). PWM on kasvijohtannainen ja se stimuloi sekä T- että B-soluja. T-solujen läsnäolo on välttämätöntä, jotta PWM voisi stimuloida B-soluja erilaistumaan ja jakautumaan. (Hay ym. 2002: 277 – 278; Folds ym. 2003: 705).

CEF-peptidiseos (CTL-CEF-class I plus pool) stimuloi peptidispesifisiä CD8-positiivisia T-muistisoluja tuottamaan interferoni-gammaa. Peptidiseos sisältää 32 peptidiä sytomegalo-, Epstein-Barr- ja influenssa-viruksilta, jotka sitoutuvat tiettyihin luokan I MHC-molekyyleihin. Useimmilla ihmisillä (n. 90 %) on elimistössään muistiefektorisoluja näitä patogeenejä vastaan, sillä suurin osa on altistunut niille jossain vaiheessa. (CEF- Class I Peptide Pool ”Plus” Product Data Sheet 2007.)

Reagenssipakkauksen mukana tuleva anti-CD3-vasta-aine aktivoi CD4- ja CD8-positiivisia T-lymfosyyttejä. Lukuisia T-solujen tuottamia sytokiineja, kuten IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 ja IL-13 saadaan erittymään tällä stimulaatiolla. CD3-spesifisiä vasta-aineita käytetään usein polyklonaalisina aktivaattoreina. (Mabtech Ab 2007: 6.)

4 PAKASTAMISEN VAIKUTUS MONOKLONAALISIIN LYMFOSYYTEIHIN

Pakastuksen aikana solujen ulkopuolella alkava jääkiteiden muodostuminen nostaa suolaväkevyyttä jäätyttömässä vesitilavuudessa. Tämä johtaa veden poistumiseen soluista. Nopean jäähtymisen avulla pyritään pitämään solun ulkopuoliset jääkiteet pieninä, jotta solut eivät vahingoittuisi. Jäähdytysnopeutta ei kuitenkaan voida nostaa kovin korkeaksi, jotta osmoottisia vaurioita ei syntyisi. Veden olisi ehdittävä siirtymään jäätyksen aikana soluista solunulkoiseen tilaan niin, että solun sisälle ei pääsisi syntymään jäätä. Intraseellulaarisen jään syntyminen tuhoaisi soluorganismeja ja rakennetta. (Schwartz – Diller 1984: 654.)

Wang ym. tutki pakastamisen vaikutuksia T-lymfosyyttien sytokiinin tuotantoon. Tutkimuksessa ihmisen verestä eristettyjä T-lymfosyyttejä pakastettiin -196°C :ssa nestetyssä eripituisia aikoja (3, 14, 21, 35 ja 50 päivää). T-solujen elinkelpoisuus ja aktiivinen sytokiinin tuottaminen tutkittiin ennen ja jälkeen pakastuksen. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää kuinka hyvin T-lymfosyytit säilyttävät kykynsä tuottaa sytokiinia pakastuksen jälkeen. Tulokset osoittivat, että pakastetut T-lymfosyytit säilyttivät kykynsä tuottaa sytokiinia yhtä hyvinä kuin tuoreilla soluilla. (Wang – Hsu – Tzeng – Hsu – Ho 1998: 22.)

Kreher ym. selvittivät tutkimuksessaan pakastamisen vaikutuksia CD4- ja CD8-positiivisten T-solujen sytokiinin tuotantoon ELISPOT-menetelmällä. Tutkimuksessa käytettiin sekä ihmisten että hiirieläinten soluja ja siinä vertailtiin PHA:lla stimuloitujen pakastettujen ja tuoreiden T-solujen sytokiinin tuotantoa. Ihmisten pakastettujen ja tuoreiden solujen sytokiinituotannossa ei havaittu eroa millään testatulla solupitoisuudella. Sen sijaan kun vastaava tutkimus suoritettiin käyttäen hiirieläimiä, havaittiin tuoreiden ja pakastettujen solujen sytokiinituotannon välillä merkittäviä eroja. Näin ollen hiirieläinten solut vaikuttavat olevan ihmisten soluja herkempiä menettämään toiminnallisuuttaan ELISPOT-menetelmässä pakastuksen aikana. (Kreher – Dittrich – Guerkov – Boehm – Tary-Lehmann 2003: 79, 84–85.)

Pakastamislämpötilojen -70°C ja -150°C välillä ei ole havaittu eroja pakastettujen solujen apoptoosin määrässä (Fowke – Behnke – Hanson – Shea – Consentino 2000: 141). Sen sijaan toistuva pakastuslämpötilojen vaihtelu (alle -130°C ja -70°C) heikentää mononuklearisolujen laatua. Tämä voitiin havaita mm. ELISPOT-mittauksen avulla. Myös solujen altistaminen suboptimaaliselle lämpötilalle (-20°C) heikentää solujen laatua. Jo tunnin altistamisen jälkeen vaikutukset ovat havaittavissa soluista ja olivat huomattavia 4-8 tunnin jälkeen. Altistamisen vaikutukset vaihtelivat huomattavasti näytteiden välillä, joten on tarpeellista määrittää näytekohtaiset hyväksymiskriteerit. Mononuklearisolujen reagoimista ELISPOT-menetelmässä heikentää myös solujen säilytys yön yli ennen pakastamista, kun taas näytteenottopäivänä jäädytetyt solut reagoivat yhtä hyvin kuin tuoreet. (Smith ym. 2007: 527, 529, 535.)

5 VIITEARVOT

5.1 Viitearvojen määritelmä

Kun laboratoriotestiä käytetään esimerkiksi diagnosointiin tai sairauden seurantaan, testituloksia verrataan viitearvoihin. Viitearvojen on määritetty olevan terveen väestön tavallisia arvoja. Viitearvot kertovat, että noin 95 % väestön arvoista osuu tälle alueelle. Näin ollen 2,5 % prosenttia terveen väestön arvoista on pienempiä kuin viitearvojen alaraja ja 2,5 % suurempia kuin yläraja. (Marshall 2000: 5-6.)

IFCC (The International Federation of Clinical Chemistry) suosittelee, että seuraavat viisi tekijää selvitetään ja määritetään ennen kuin viitearvoja aletaan osoittaa.

1. Väestö-otannan jakauma iän, sukupuolen sekä geneettisten ja sosiologisten tekijöiden suhteen.
2. Kriteerit, joiden perusteella yksittäiset tutkimusjoukon edustajat otetaan mukaan tai jätetään tutkimuksen ulkopuolelle.
3. Fysiologiset ja ympäristölliset tekijät, jotka vaikuttavat tutkimuksen suorittamisen aikana. Näitä tekijöitä ovat mm. näytteiden keräämisen aika, syöminen tai lääkkeiden ottaminen, näytteenottoasento, tupakointi, ylipainon aste sekä kuukautiskierron vaihe.
4. Näytteenottoprosessi, mukaan lukien tutkittavan valmistelu.
5. Käytettävät analyttiset menetelmät sekä niiden tarkkuus ja luotettavuus. (Carreiro-Lewandowski 2005: 57.)

5.2 Viitearvojen määrittäminen

Viitearvoja määritettäessä tulisi aina käyttää terveitä henkilöitä tutkimusjoukkona, sillä sairaudet ja lääkitykset voivat vääristää tuloksia. Lisäksi tutkittavien tulisi vastata mahdollisimman hyvin sitä väestöryhmää, joihin viitearvoja tullaan käyttämään. Tutkimusjoukon tulisi sisältää sekä miehiä että naisia monista ikäryhmistä. Ikäryhmät voidaan jakaa esimerkiksi Winstenin suosituksen mukaan neljään luokkaan: vastasyntyneet, lapset (esipuberteetit), aikuiset sekä vanhukset (yli 60 vuotiaat miehet ja vaihdevuodet ohittaneet naiset). (Carreiro-Lewandowski 2005: 57 – 58.)

Tutkimusjoukkoon kuuluvista henkilöistä tulisi kerätä kaikki tarpeellinen tieto kuten ikä, sukupuoli, terveydentila, aktiviteettitaso, pituus ja paino, alkoholin kulutus, lääkitys, tupakointi sekä kuukautiskierron vaihe esimerkiksi haastattelemalla. Näitä tietoja voidaan käyttää henkilön poissulkemiseen tutkimuksesta tai selittämään mahdollisia epänormaaleja arvoja. Raskaana olevat sekä akuuttia tai kroonista tautia sairastavat tulisi sulkea pois tutkimuksesta. Lisäksi tutkittavia tulisi ohjeistaa siitä miten näytteenottoa varten tulee valmistautua, esimerkiksi jos heidän tarvitsee olla syömättä ja juomatta ennen näytteenottoa. Kaikkien tutkimusjoukkoon kuuluvien henkilöiden näytteet tulisi kerätä samalla tavalla samanlaisissa olosuhteissa ja mahdolliset vuorokaudenajan vaihtelun vaikutukset tutkittavaan suureeseen tulisi ottaa huomioon. Kerätyt tutkimustulok-

set syötetään oheistietojen kanssa tietokoneelle ja niistä muodostetaan diagrammeja. Mikäli poikkeavia arvoja löytyy, on potilas ohjattava lääkärille. Jos syy poikkeavaan arvoon tiedetään, henkilön näyte poistetaan tutkimuksesta. (Carreiro-Lewandowski 2005: 58.)

6 TYÖN TARKOITUS

Työni tarkoituksena on primaaristen immuunivajavuustilojen diagnostiikkaan soveltuvan ELISPOT-menetelmän alustava pystyttäminen ja testaaminen. Työni tavoitteena on selvittää voisiko ELISPOT-menetelmässä käyttää pakastettuja soluja viitearvojen määrittämiseen. Koska tavoitteena on määrittää pakastettuja näytteitä, tulee ensin selvittää kuinka hyvin pakastetut solut vastaavat sytokiinin tuotannoltaan tuoreita soluja. Lisäksi tavoitteena on kehittää menetelmää vertaamalla inkubaatioaikoja ja optimoida ELISPOT titraamalla mitogeeneja.

Työni tavoitteena oli saada vastaukset seuraaviin kysymyksiin:

1. Miten pakastettujen ja tuoreiden monoklonaalisten lymfosyyttien sytokiinin tuotanto eroaa toisistaan ELISPOTissa?
2. Mitkä ovat pakastetuista näytteistä määritettävät alustavat viitearvot?
3. Millaiset ovat optimaaliset mitogeenikonsentraatiot Con A, PWM ja PHA-mitogeeneilla ELISPOTilla?
4. Miten yhden ja kolmen vuorokauden inkubaatio lämpökaapissa vaikuttaa solujen sytokiinin tuotantoon?

7 TYÖN TOTEUTTAMINEN

Opinnäytetyöni tein HUSLABin mikrobiologian vastualueen immunologian vastuuyksikölle keväällä 2008. Kyseessä oli kokeellinen tutkimus. Mabtech Ab:n IFN- γ ELISPOT-reagenssipakkauksen mukana tuli hiiren monoklonalisella IFN- γ -vasta-aineella päällystetty 96 kuoppainen levy, konjugaatti, streptavidin-ALP, substraatti sekä CD3-monoklonaalinen vasta-aine. Työssäni käytetyt reagenssit on listattu liitteessä 2.

Opinnäytetyötäni tehdessäni seurasin tarkasti työohjeita ja sain tarvittaessa neuvoja ja apua ohjaajiltani laboratoriossa. IFN- γ ELISPOT-työohje on liitteessä 3. Pidin päivittäin myös työpäiväkirjaa, johon kirjoitin ylös työvaiheeni.

7.1 Tutkimusaineisto ja eettinen pohdinta

IFN- γ ELISPOT-menetelmässä käytetään näytteinä ihmisen verestä eristettyjä mononukleaarisia valkosoluja. Pakastetuista soluista tehtiin alustaviin viitearvomäärittelyihin käytetyt potilasnäytteet olivat valmiina immunologian osaston pakastimessa.

Tuoreiden ja pakastettujen näytteiden vertailussa käytettiin näyttemateriaalina kolmelta perusterveeltä henkilökunnan jäseneltä otettuja verinäytteitä. Vertailukohtana käytettiin samoilta henkilökunnan edustajilta aikaisemmin otettuja ja pakastettuja soluja. Mitogeenien laimennossarjoihin käytettiin tuoreista näytteistä eristettyjä soluja. Näytteet otettiin henkilökunnan jäseniltä sekä yhdeltä perusterveeltä opiskelijalta. Inkubaatio-aikatutkimus tehtiin myös tuoreista näytteistä eristetyistä soluista. Tutkimuksissa käytettävät näytteet ja niiden nimeäminen on esitetty taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Tutkimuksissa käytettyjen näytteiden nimeäminen

Tutkimus	Näyte	Koodit
Tuoreet vs. pakastetut	Henkilökunta	HK1 – HK3
Mitogeenien laimennos	Henkilökunta	HK4 – HK5
	Opiskelija	HK6
Inkubaatioaika	Henkilökunta	HK5
	Opiskelija	HK6

Kirjallisen tutkimusluvan (liite 4) myönsi vastualuejohtaja ja eettisen toimikunnan lupaa ei tutkimukselleni tarvittu. Henkilökunnan jäsenet ja opiskelija osallistuivat tutkimukseeni vapaaehtoisesti ja heillä oli oikeus kieltäytyä antamasta verinäytettä halutessaan. Kaikki tutkimuksessa saatu tieto oli luottamuksellista. Näytteet on koodattu niin, ettei potilaan tai henkilökunnan jäsenen henkilöllisyys tule niistä ilmi.

7.2 Pakastettujen solujen sulatus ja eristys

Aluksi valmistettiin pesupuskuri laimentamalla 10x CTLW-010 wash supplement steriiliin RPMI1640-liuokseen (50 ml + 450ml). Pesupuskuriin lisättiin glutamiinia (laimennos 1:100) sekä antibiootteja (Pen-Strep liuos, laimennos 1:100). Pakastetut solut haettiin nestetypistä ja sulatettiin nopeasti 37°C:n juoksevan veden alla. Putkia käänneltiin varovasti sulatuksen aikana, jotta sulaminen tapahtuisi tasaisesti ja nopeasti. Kun soluputket olivat lähes kokonaan sulaneet, solut siirrettiin steriilisti laminaarikaapissa 15 ml:n polypropyleeni falcon-putkeen. Soluputki huuhdottiin 1 ml:lla lämpökaapissa esilämmitetyllä pesupuskurilla ja lisättiin tipoittain sulatettujen solujen päälle. Solujen päälle lisättiin tipoittain 3 ml pesupuskuria ja suspensiota sekoitettiin varovasti käännellen. Tämän jälkeen lisättiin vielä 5 ml pesupuskuria jolloin solususpension määräksi tuli yhteensä 10 ml.

Solususpensio sentrifugoitiin (Megafuge 1.0 Heraeus instruments) huoneenlämmössä 330G 10 minuuttia, jonka jälkeen solut olivat jääneet putken pohjalle. Solujen päällä oleva supernatantti imettiin imulaitteen avulla varovasti pois ja putken pohjalle jääneet solut suspensoitiin huolellisesti 1 ml:aan pesupuskuria. Tämän jälkeen lisättiin 9 ml pesupuskuria solususpension päälle ja sentrifugoitiin toisen kerran (330G 10 min). Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti imettiin varovasti pois solujen päältä ja solut suspensoitiin huolellisesti 1ml:aan esilämmitettyä soluviljelymediaa (CTL-TestTM Medium). Soluviljelyliuokseen oli lisätty glutamiinia ravinteeksi ja antibiootteja (penisilliiniä ja streptomysiiniä) kontaminaatioiden kasvun estämiseksi. Samaa sentrifugia käytettiin sekä pakastettujen että tuoreiden solujen eristämisessä.

Solususpensiota otettiin 50 µl ja solut laskettiin ADVIA60-analysaattorin avulla. Analysaattorin antamien tulosten avulla laskettiin IFN-γ ELISPOT-testiä varten $2,0 \times 10^6$ tai $1,0 \times 10^6$ solua ja $3,0 \times 10^5$ solua jokaisesta näytteestä ja laimennettiin ne 1 ml:ksi soluviljelyliuokseen. Näin saatiin solususpensiot joiden konsentraatiot olivat $1,0 \times 10^6$ /ml, $2,0 \times 10^6$ /ml ja $3,0 \times 10^5$ /ml.

7.3 Tuoreiden solujen eristys

Verinäytteet henkilökunnan jäsenistä otettiin 8 ml:n Vacutainer™CPT™ -putkiin. Putkissa oli antikoagulanttina 0.1M natriumsitraatti sekä Ficoll-Hypaque-liuosta ja polyesterigeeliä. Näytteet sentrifugoitiin mahdollisimman nopeasti huoneenlämmössä 30 min 1600G ilman jarrua. Sentrifugoinnin jälkeen punasolut ja neutrofiilit jäivät geelin alle ja geelin päälle tuli Ficoll-liuos, plasma ja mononukleaariset solut. Koska soluja säilytetään plasmassa, putkea käännettiin 3-5 kertaa varovasti, jotta solut ja plasma sekoittuivat. Solut ja plasma kaadettiin 15 ml:n falcon-putkeen ja päälle lisättiin pesupuskuria ad. 15 ml. Solususpensio sentrifugoitiin 15 min 600G huoneenlämmössä jarrua käyttäen. Sentrifugoinnin jälkeen solujen päältä poistettiin supernatantti varovasti imulaitteen avulla ja putken pohjalle kerääntyneet solut suspensoitiin hyvin 1 ml:aan pesupuskuria. Suspensioon lisättiin vielä pesupuskuria ad. 10 ml.

Seuraavaksi solususpensio sentrifugoitiin huoneenlämmössä 10 min 330G jarrua käyttäen. Sentrifugoinnin jälkeen poistettiin supernatantti solujen päältä ja solut suspensoitiin hyvin 1ml:n soluviljelyliuosta (CTL-Test™ Medium). Solut laskettiin ADVIA60-analysaattorilla samalla tavalla kuin sulatetut solutkin. IFN-γ ELISPOT-testiä varten laskettiin $2,0 \times 10^6$ ja $3,0 \times 10^5$ solua jokaisesta näytteestä ja laimennettiin ne 1 ml:ksi soluviljelyliuokseen. Saatiin solususpensiot joiden konsentraatiot olivat $2,0 \times 10^6/\text{ml}$ ja $3,0 \times 10^5/\text{ml}$. Mitogeenien laimennossarjaa tehtäessä ja inkubaatioaikavertailussa käytettiin vain solususpensiota, jonka pitoisuus oli $2,0 \times 10^6/\text{ml}$.

7.4 IFN-γ ELISPOTin suoritus

7.4.1 Levyn esivalmistelu (blokkauk)

IFN-γ ELISPOT-reagenssipakkaus sisältää yhden hiiren monoklonalisella IFN-γ-vastaaineella päällystetyn filteripohjaisen kuoppalevyn, jossa on 12 kappaletta kahdeksan kuopan liuskoja eli strippejä. Levylle jätettiin haluttu määrä liuskoja ja se pestiin neljä kertaa steriilillä fosfaatilla puskuroidulla keittosuolaliuoksella PBS:llä (phosphate buffered saline) 200 µl/kuoppa. Pesun jälkeen kuoppalevylle lisättiin CTL:n test-mediaa 200

μl/kuoppa ja sen annettiin inkuboitua huoneenlämmössä vähintään puoli tuntia. Test-mediana käytettiin samaa soluviljelymediaa, jota käytettiin solujen eristämisessä. Työvaiheet suoritettiin steriilisti laminaarikaapissa.

7.4.2 Solujen stimuloiminen

Kuoppalevyltä poistettiin soluviljelymedia, jolla se oli esivalmisteltu, blokattu. Testissä solujen stimuloimiseen käytettävät antigeenit ja mitogeenit laimennettiin haluttuun konsentraatioon viljelymediaa ja pipetoitiin 50 μl kuoppaa kohden pipetointikartan (taulukko 2) mukaisessa järjestyksessä. Solususpensiota, jossa oli haluttu määrä soluja, pipetoitiin pipetointikartan mukaan 100 μl kuoppaa kohden. Työvaiheet suoritettiin edelleen steriilisti laminaarikaapissa. Levy käärittiin alumiinifolioon haihtumisen estämiseksi. Levyä inkuboitui yhden vuorokauden ajan 5 % hiilidioksidiatmosfäärissä 37°C:ssa. Inkubaation aikana solujen erittämät IFN-γ-sytokiinit tarttuivat kuoppien pohjassa oleviin spesifisiin vasta-aineisiin.

Negatiivisena kontrollina käytettiin soluviljelymediaa (CTL test-media), joka ei stimuloi soluja. Negatiivisen kontrollin avulla pyrittiin selvittämään epäspesifisen sytokiinin tuotannon ja artefaktin aiheuttamien spottien määrä. Positiivisena kontrollina käytettiin reagenssipakkauksen mukana tullutta anti-CD3-vasta-ainetta.

TAULUKKO 2. Esimerkki pipetointikartasta. Kartassa on esitetty solumäärät, näytteet, negatiivinen kontrolli ja mitogeenit.

solua/kuoppa	Näyte 1	Näyte 2	Näyte 3 jne...
200 000	Media	Media	
	Con A 2,5 μg/ml	Con A 2,5 μg/ml	
	Con A 5 μg/ml	Con A 5 μg/ml	
	CEF	CEF	
30 000	anti CD3-vasta-aine	anti CD3-vasta-aine	
	PHA 2,5 μg/ml	PHA 2,5 μg/ml	
	PHA 10 μg/ml	PHA 10 μg/ml	
	PWM 2,5 μg/ml	PWM 2,5 μg/ml	

7.4.3 Vasta-ainekonjugaatin ja Streptavidiinin lisääminen

Kun kuoppalevy oli inkuboitunut yhden vuorokauden ajan, solususpensio kaadettiin levyltä pois. Kuoppalevy pestiin PBS:llä viisi kertaa (200µl/kuoppa), jotta solut ja kaikki ylimääräinen materiaali saataisiin pois.

Reagenssipakkauksessa oli valmiina konjugaatti, joka laimennettiin 1µg/ml (1:1000) PBS:llä, johon oli lisätty 0,5 % FCS (fetal calf serum). Konjugaattia (7-B6-1-biotin) lisättiin 100µl jokaiseen kuoppaan ja inkuboitin huoneenlämmössä kahden tunnin ajan. Konjugaatti on biotiinilla leimattua IFN-γ vasta-ainetta. Inkubaation aikana konjugaatin sisältämä vasta-aine liittyi kuopan pohjalla olevaan sytokiini-vasta-ainekompleksiin kiinnittymällä IFN-γ molekyylin toiseen epitooppiin.

Konjugaatti-inkubaation jälkeen kiinnittymätön konjugaatti poistettiin pesemällä levy viisi kertaa PBS:llä. Reagenssipakkauksen Streptavidiini-ALP laimennettiin 1µg/ml (1:1000) PBS-0,5 % FCS:llä. Alkaalisella fosfataasilla (ALP) konjugoitua Streptavidiinia lisättiin 100µl jokaiseen kuoppaan ja inkuboitin yhden tunnin ajan huoneenlämmössä. Streptavidiini kiinnittyy sytokiini-vasta-ainekompleksiin kiinnittyneeseen konjugaattiin konjugaatin sisältämän biotiinin ansiosta.

7.4.4 Substraatin lisääminen

Streptavidiini-inkubaation jälkeen kiinnittymätön streptavidiini ja entsyymi pestiin pois PBS:llä. Reagenssipakkauksen mukana tuleva käyttövalmis substraattiliuos (BCIP/NBT-plus) suodatettiin 0,45µm suodattimen läpi ja lisättiin 100µl jokaiseen kuoppaan. BCIP (5-bromo, 4-chloro, 3-indolyphosphate) toimii substraattina alkaaliselle fosfataasille ja NBT (nitroblue tetrazolium) vaihtaa saostumien reaktiokohdissa väriä violetinruskeaksi, jolloin spotit tulevat näkyviksi. Inkubointi tapahtuu alle kymmenessä minuutissa. Pidempi inkubaatio saattaa aiheuttaa taustan värjäytymistä. Värireaktion kehittyminen pysäytettiin huuhtelemalla levy huolellisesti vedellä useaan kertaan. Huuhtelun jälkeen kuoppalevy vietiin kuivumaan lämpökaappiin, jonka jälkeen spottien määrä voidaan laskea ELISPOT-lukijalaitteella.

7.5 Pakastettujen ja tuoreiden näytteiden vertailu

Pakastamisen vaikutuksia solun sytokiinin tuotantoon selvitettiin stimuloimalla saman henkilön tuoreita ja pakastettuja soluja samoilla mitogeeneilla. Tutkimus aloitettiin ottamalla verta kolmesta eri henkilökunnan jäsenestä (HK1, HK2 ja HK3). Tuoreista näytteistä eristettiin solut ja vertailukohtana käytettiin samoilta henkilöiltä aikaisemmin otettuja, verinäytteestä eristettyjä, pakastettuja soluja. Kunkin henkilön pakastetuista ja tuoreista soluista tehtiin solususpensiot, joiden konsentraatiot olivat $2,0 \times 10^6/\text{ml}$ ja $3,0 \times 10^5/\text{ml}$. Jokaisesta pakastetusta ja tuoreesta näytteestä tehtiin rinnakkaismääritykset. Media, Con A ja CEF-peptidiseos kuopissa oli 200 000 solua/kuoppa ja anti-CD3, PWM ja PHA kuopissa 30000 solua/kuoppa.

7.6 Pakastettujen solujen analyysi mahdollisten viitearvojen laskentaa varten

Pakastetut potilasnäytteet sulatettiin ja niistä tehtiin kaksi sarjaa, joissa kummassakin kuoppalevyllä tuli kuusi näytettä. Ensimmäiselle levyllä tulevien näytteiden soluista tehtiin jokaisesta solususpensiot, joiden konsentraatiot olivat $1,0 \times 10^6/\text{ml}$ ja $3,0 \times 10^5/\text{ml}$. Toiselle levyllä tulevien näytteiden soluista tehtiin jokaisesta solususpensiot, joiden konsentraatiot olivat $2,0 \times 10^6/\text{ml}$ ja $3,0 \times 10^5/\text{ml}$.

Tutkimus suoritettiin niin, että ensimmäisellä kuoppalevyllä media, Con A ja CEF kuopissa solujen määrä oli 100 000 solua/kuoppa ja toisella kuoppalevyllä 200 000 solua/kuoppa. Solumäärää vaihdettiin kesken tutkimuksen siksi, että isommalla solumäärällä saataisiin aikaan enemmän spotteja. Molemmissa kuoppalevyissä käytettiin anti-CD3, PWM ja PHA kuopissa solumääränä 30 000 solua/kuoppa.

7.7 Mitogeenien titraus

Tutkimus aloitettiin tekemällä laimennossarjat Con A:sta, PWM:sta sekä PHA:sta. Kaikkia kolmea mitogeenia titrattiin alaspäin niin kauan, että pitoisuudet eivät enää tuottaneet spotteja. Con A konsentraatioita titrattiin myös ylöspäin, jotta saataisiin selville millaisella konsentraatiolla spotteja muodostuu liikaa. Titraamisella pyrittiin selvit-

tämään optimaaliset pitoisuudet kullekin mitogeenille. Tutkimukseen käytettiin solususpensiota jonka pitoisuus oli $2,0 \times 10^6/\text{ml}$.

Alaspäin titraaminen Con A:lla aloitettiin pitoisuudesta $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$, josta tehtiin laimennosarja pitoisuuksiin 1:2, 1:4, 1:8 ja 1:16. Myös Con A:n ylöspäin titraaminen aloitettiin pitoisuudesta $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$, josta tehtiin pitoisuudet 2:1, 4:1 ja 8:1.

PWM titrattiin alaspäin pitoisuudesta $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ pitoisuuksiin 1:2, 1:4, ..., 1:8192. PHA titrattiin samasta alkupitoisuudesta pitoisuuksiin 1:4, 1:8, 1:16 ja 1:32.

7.8 Inkubaatioajan vertailu

Tutkimus suoritettiin niin, että samalla kerralla tehtiin kaksi kuoppalevyä, joista toista inkuboitui lämpökaapissa 5 % hiilidioksidiatmosfäärissä 37°C :ssa normaalisti yhden vuorokauden ajan ja toista samassa lämpökaapissa kolmen vuorokauden ajan. Näytteinä käytettiin henkilöiden HK5 ja HK6 tuoreista verinäytteistä eristettyjä mononukleaarisoluja. Molemmissa levyissä oli samat näytteet, mitogeenikonsentraatiot ja solususpension pitoisuudet ($2,0 \times 10^6/\text{ml}$).

Yhden vuorokauden ajan inkuboituvassa kuoppalevyssä näytteistä tehtiin rinnakkaismääritykset, joista laskettiin keskiarvot. Näytemäärä ei enää kuitenkaan riittänyt rinnakkaismäärityksen tekoon kolmen vuorokauden kuoppalevyssä, joten siinä molemmista henkilöistä on vain yksi sarja.

7.9 Tulosten analysointi

Tulokset analysoitiin Biomedicumissa Bioreader 3000 ELISPOT-lukijalla (Biosys Inc.). Bioreader-lukija ottaa kuvan kuoppalevyn kaivon filtteripohjasta, jonka jälkeen kameran kuva välittyy ohjelmistoon, jossa värispottien lukumäärä lasketaan niiden koon, intensiteetin ja värin perusteella. Kuoppalevyt analysoitiin myös AID ELISPOT-lukijalla, joka myös ottaa kuvan kuopista ja analysoi spottien määrän koon, intensiteetin ja värin perusteella. Tulokset analysoitiin molemmilla lukijalaitteilla siksi, että Bioreader-laite ei pystynyt lukemaan kuoppia, joissa spotteja oli hyvin paljon tai jotka olivat hyvin tummia. AID-laite ei myöskään pystynyt laskemaan kunnolla tällaisia kuoppia. Työn suori-

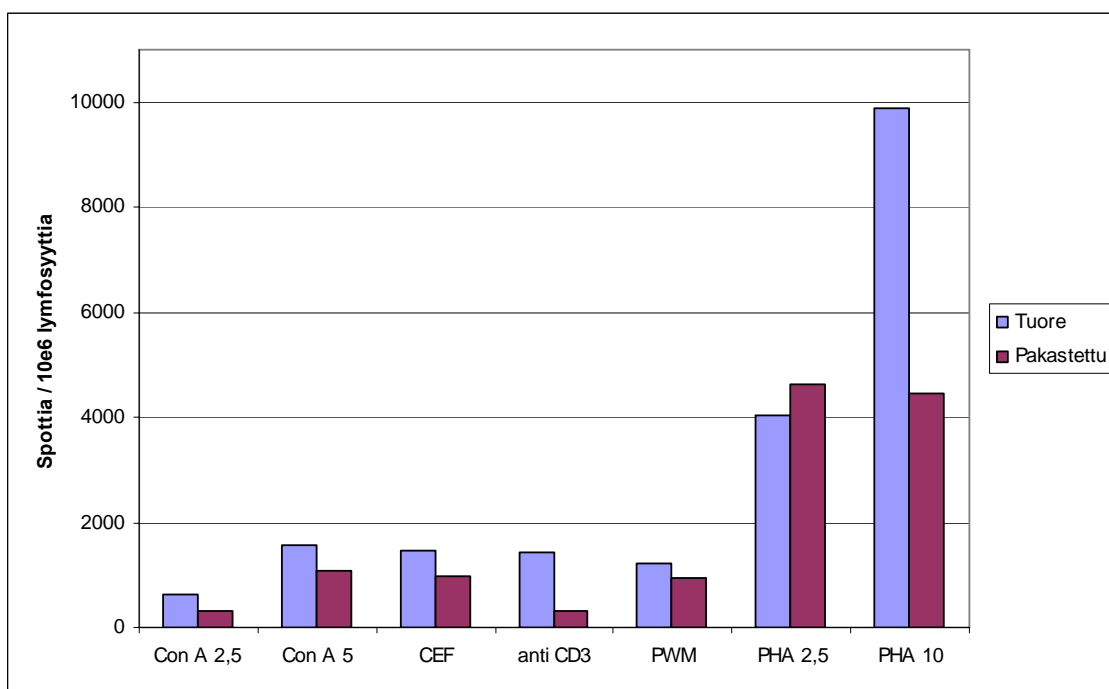
tuksen aikana AID-laitetta ei ollut kalibroitu vastaamaan Bioreaderin lukemia. AID-laitteella kuoppalevystä voitiin tulostaa värituloste, josta voitiin silmämääräisesti katsoa, mitkä kuopista laitteet olivat pystyneet analysoimaan luotettavasti. Tulosten taulukoinnissa käytettiin Exel-ohjelmaa, jolla piirrettiin myös kuvaajat ja pylväsdiagrammit.

Niin pakastettujen kuin tuoreidenkin näytteiden antamien spottien määrästä vähennettiin negatiivisen kontrollin kuopissa olevien spottien määrä. Jos näytteestä oli tehty rinnakkaismäärittys, rinnakkaisista laskettiin keskiarvo, josta vähennettiin negatiivisten kontrollien rinnakkaismäärittysten keskiarvot. Näin saatiin selville solujen spesifi reaktio stimulantille, sillä voitiin olettaa, että kaikki negatiivisen kontrollin kuopissa olevat spotit ja näin ollen myös osa näytekuoppien spoteista oli epäspesifistä sytokiinin tuotantoa. Lopuksi laskettiin spottien lukumäärän sekä ADVIA60-analysaattorin antamien lymfosyyttiprosenttien avulla spottien määrä miljoonaa lymfosyyttiä kohden. Jatkossa tulokset ilmoitetaan yksikössä spottia / 10^6 lymfosyyttiä, ellei toisin ilmoiteta.

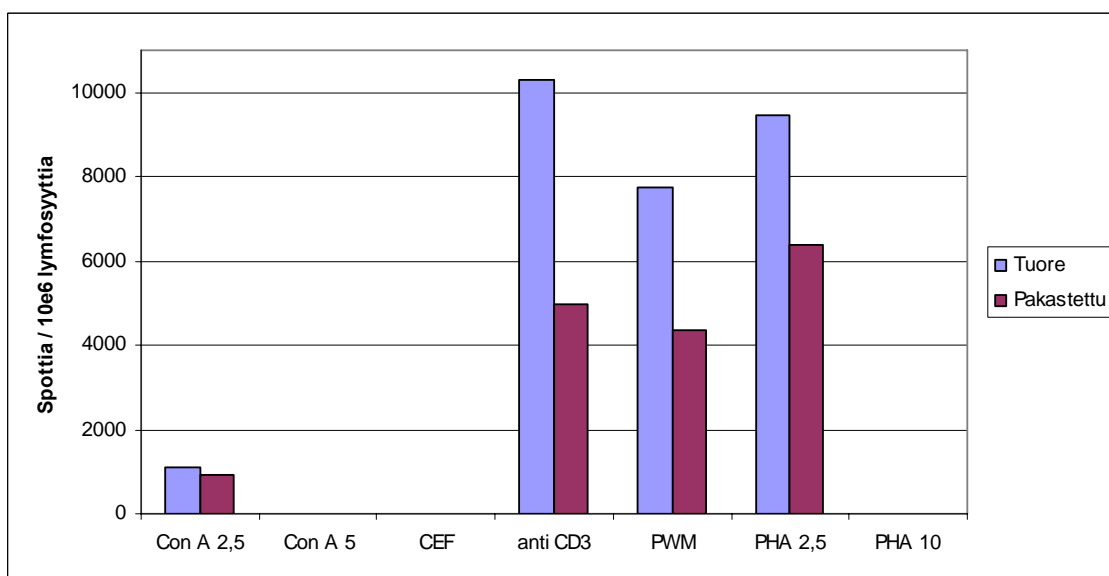
8 TYÖN TULOKSET

8.1 Pakastettujen ja tuoreiden näytteiden vertailu

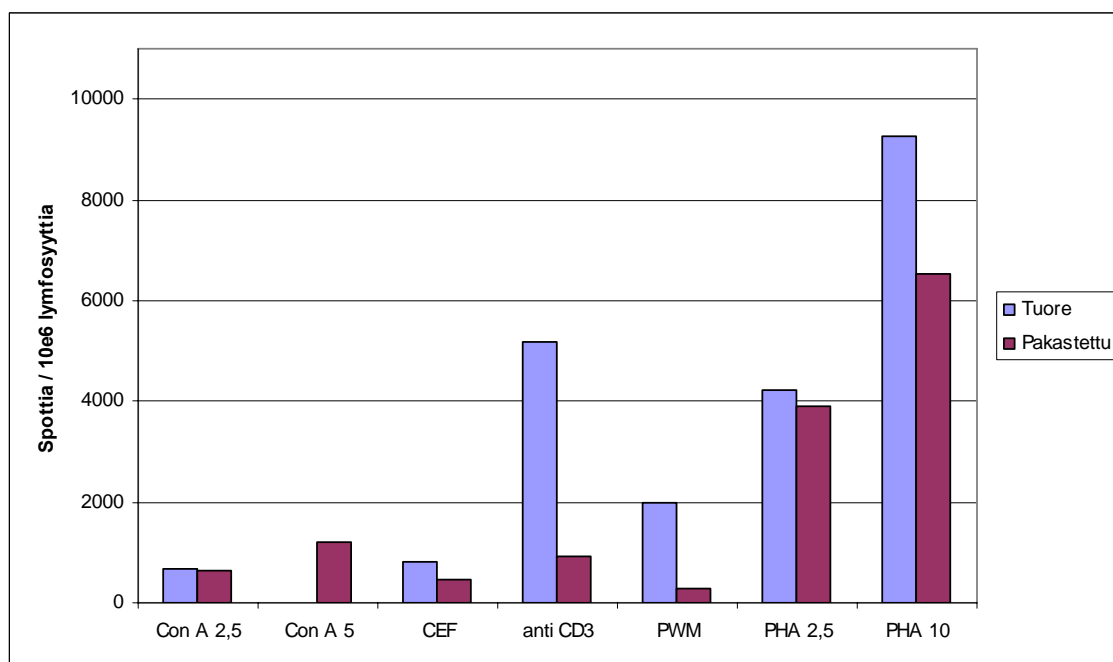
Ensimmäisenä tutkimuskohteena oli pakastettujen ja tuoreiden näytteiden vertailu. Vertailulla pyrittiin selvittämään antavatko pakastetut solut samanlaisia ELISPOT-tuloksia kuin tuoreet solut. Jokaisen henkilön pakastettujen näytteiden rinnakkaismäärittysistä laskettiin keskiarvo ja niiden antamia tuloksia verrattiin tuoreiden näytteiden rinnakkaismäärittysten keskiarvoihin (kuvio 2, kuvio 3 ja kuvio 4). Kuopat, joissa oli liikaa spotteja, jotta niitä olisi voitu laskea laitteella, on jätetty pois pylväsdiagrammeista. Näissä kuopissa spottien määrää ei voitu muuttaa spotteja/E6 lymfosyyttiä -muotoon eikä niistä voitu myöskään laskea keskiarvoa.



KUVIO 2. Henkilön HK1 tuoreen ja pakastetun näytteen vertailu eri stimulantteilla.



KUVIO 3. Henkilön HK2 tuoreen ja pakastetun näytteen vertailu eri stimulantteilla. Con A 5 µg/ml, CEF ja PHA 10 µg/ml puuttuvat kuviosta, koska kuopissa oli liikaa spotteja eikä lukijalaite kyennyt niitä laskemaan.



KUVIO 4. Henkilön HK3 tuoreen ja pakastetun näytteen vertailu eri stimulantteilla. Tuoreilla soluilla tehty Con A 5 $\mu\text{g/ml}$ puuttuu kuviosta, koska kuopissa oli liikaa spotteja eikä lukijalaite kyennyt niitä laskemaan.

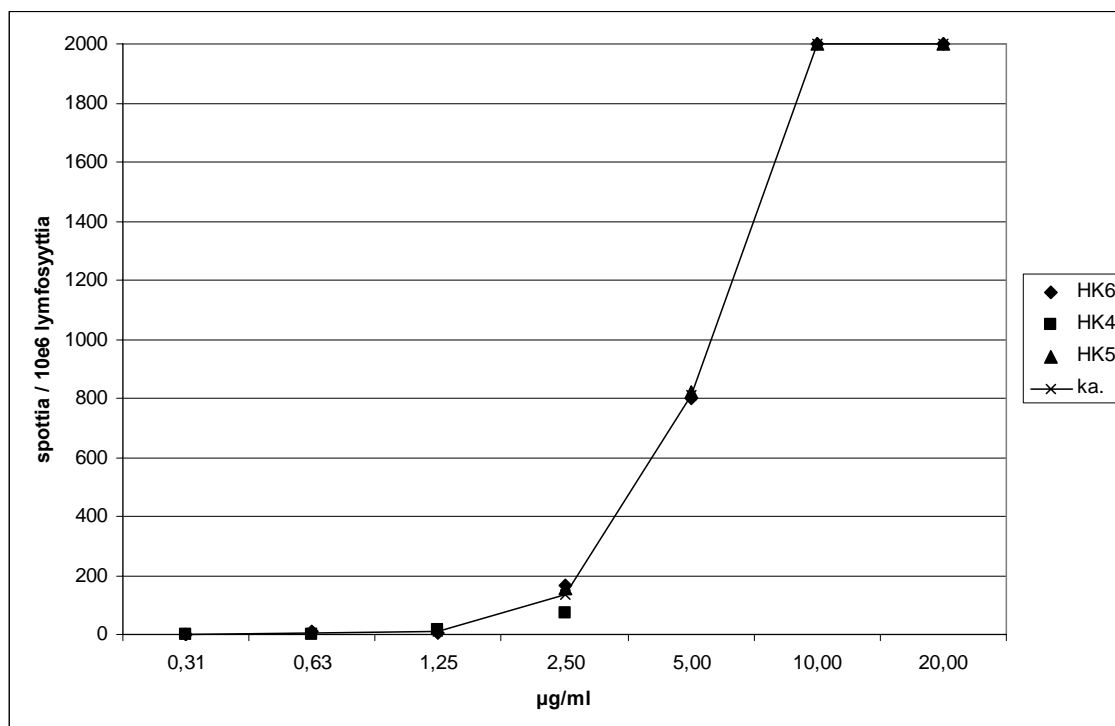
Tuloksista voidaan todeta, että erot pakastettujen ja tuoreiden näytteiden antamien ELISPOT-tulosten välillä ovat melko suuria muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta. Tuoreilla soluilla saadut spottimäärät ovat suurempia kuin pakastetuilla soluilla saadut. Ainoastaan näytteen HK1 PHA 2,5 $\mu\text{g/ml}$ stimuloidut pakastetut solut antavat enemmän spotteja kuin vastaavat tuoreet solut. Tuloksista voidaan päätellä, että pakastettujen solujen sytokiinin tuotanto ei vastaa tuoreiden solujen sytokiinin tuotantoa.

8.2 Viitearvojen määrittäminen pakastetuista potilasnäytteistä

Ensimmäisellä levyllä pakastetut näytteet reagoivat vaihtelevasti ja samoilla mitogeeneillä stimuloitaessa vaihtelut spottien määrässä näytteiden välillä olivat suuria. Jotkut näytteistä eivät reagoineet vahvoille mitogeeneille ollenkaan. Ensimmäiseltä levyltä saatujen tulosten perusteella solumäärää nostettiin toisella levyllä 100 000 solusta/kuoppa 200 000 soluun/kuoppa. Solumäärän nostaminen ei auttanut, sillä näytteet reagoivat myös toisella levyllä hyvin vaihtelevasti. Tulosten perusteella todettiin, että pakastetut näytteet eivät sovellu viitearvojen määrittämiseen ja menetelmän pystyttämiseen. Tästä syystä pakastettujen näytteiden analysointia alustavien viitearvojen määrittämiseksi ei jatkettu.

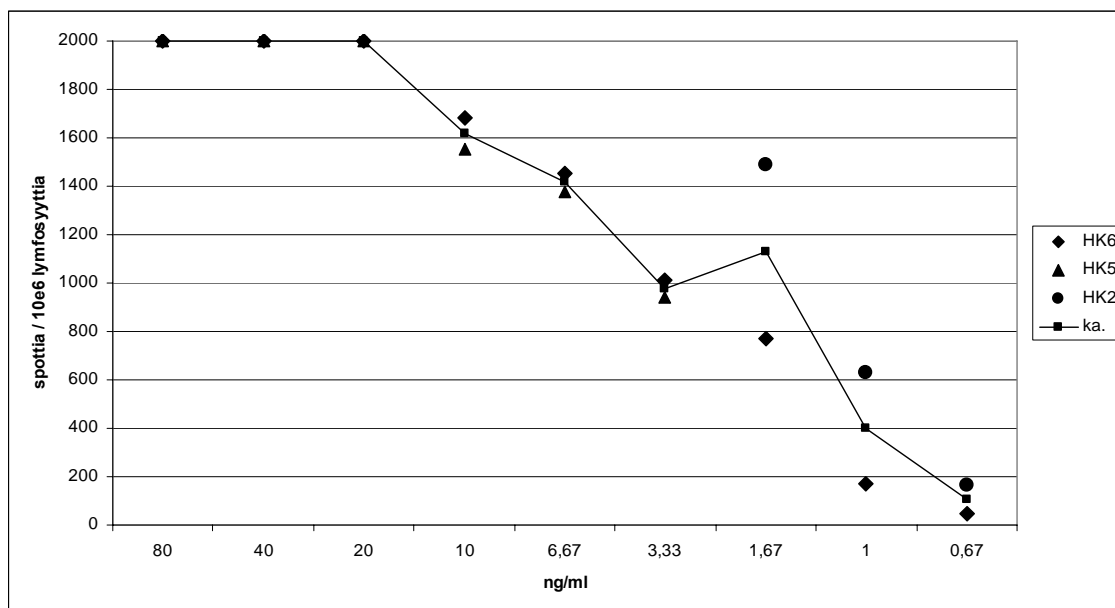
8.3 Mitogeenien laimennossarjat

Kolmantena tutkimuskohteena oli kolmen mitogeenin (PWM, Con A ja PHA) titraaminen. Kuvioissa 5, 6 ja 7 oleva käyrä on piirretty näytteiden keskiarvon (ka) perusteella. Yksittäiset koehenkilöiden tulokset on esitetty pisteinä. Pitoisuudet, joista ei pystytty laskemaan spotteja, on ilmaistu kuvaajissa arvolla 2000. Kuvaajista on jätetty pois osa pitoisuuksista, jotka tuottivat liikaa spotteja tai olivat liian pieniä tuottaakseen spotteja. Selvyyden vuoksi kuvaajiin on jätetty vain muutama tällainen arvo molempiin päihin.



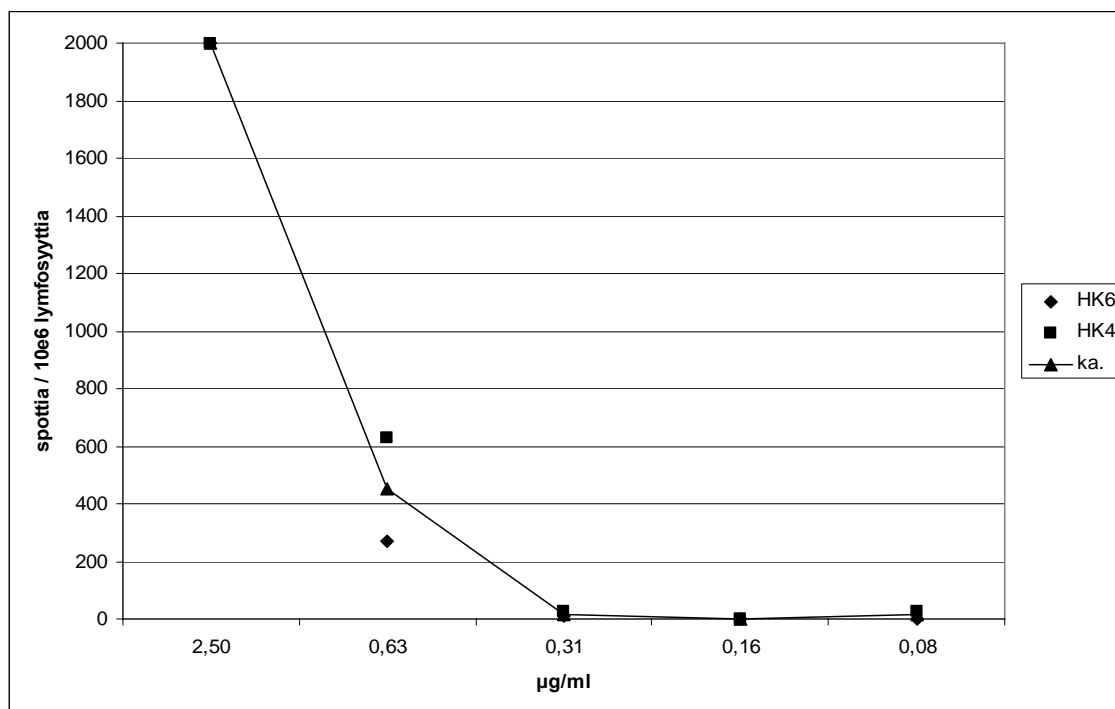
KUVIO 5. Con A:n titraaminen.

Kuvaajasta voidaan todeta, että Con A reagoi konsentraatiolla 2,5 µg/ml, mutta sitä pienemmät pitoisuudet tuottivat hyvin vähän spotteja. Kun Con A:ta titrattiin ylöspäin se reagoi konsentraatiolla 5 µg/ml vahvasti ja antoi riittävän määrän spotteja, mutta sitä suuremmat pitoisuudet tuottivat niin paljon spotteja, ettei niitä voinut mitata. Tuloksista voidaan todeta, että Con A:lla suboptimaalinen ja optimaalinen pitoisuus on 2,5 µg/ml ja 5 µg/ml. Solumääränä 200 000 solua/kuoppa oli tälle mitogeenille sopiva.



KUVIO 6. PWM:n titraaminen alaspäin. Pitoisuudet ilmaistu nanogrammoina.

Kuviossa 6 olevat pitoisuudet on ilmaistu yksikössä ng/ml ($1000\text{ng} = 1\mu\text{g}$), koska titratut pitoisuudet ovat niin pieniä. Tuloksista voidaan todeta, että PWM reagoi hyvin vahvasti. Ensimmäiset kuopat, jotka pystyttiin lukemaan, olivat vasta PWM konsentraation 20 ng/ml kohdalla ja jälkeen. Suuremmat pitoisuudet antoivat niin paljon spotteja, ettei niitä pystytty lukemaan. Vaikka spotteja ei pystytty lukija-laitteen avulla lukemaan, silmämääräisesti spottien määrä kuitenkin väheni myös näissä kuopissa mitä enemmän PWM:a titrattiin alaspäin. Tutkimus tehtiin kaikkien kolmen mitogeenin kohdalla solumäärällä 200 000 solua/kuoppa. Tämä oli PWM:lle liian suuri solumäärä ja spotteja tuli sen vuoksi niin paljon suuremmissa pitoisuuksissa.

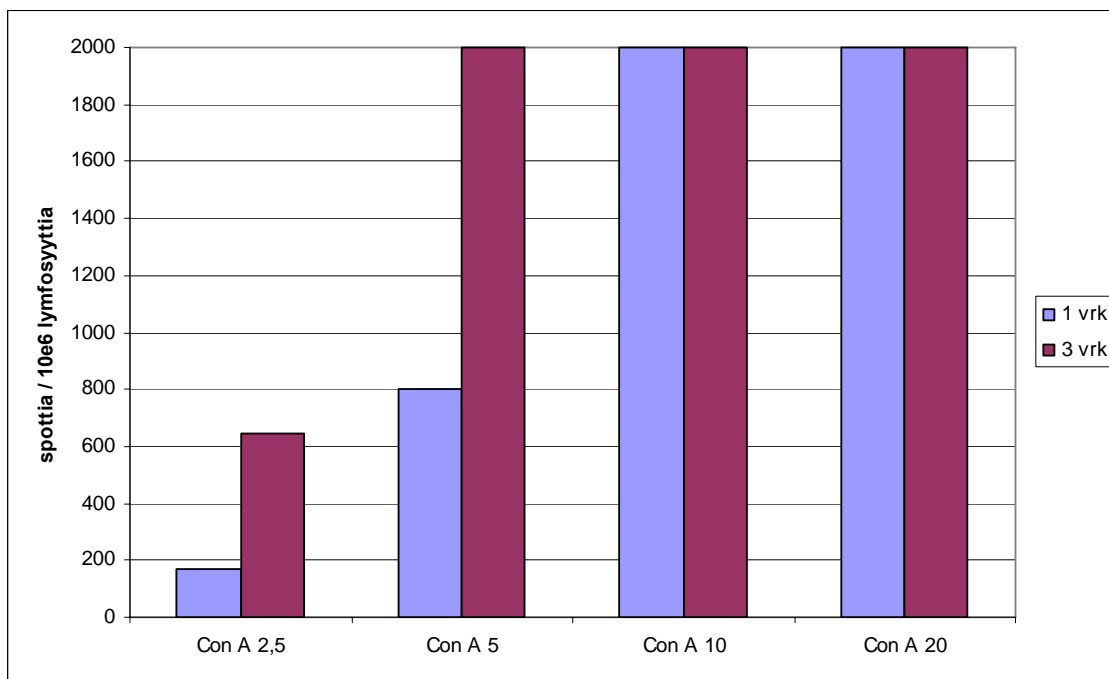


KUVIO 7. PHA:n titraaminen alaspäin.

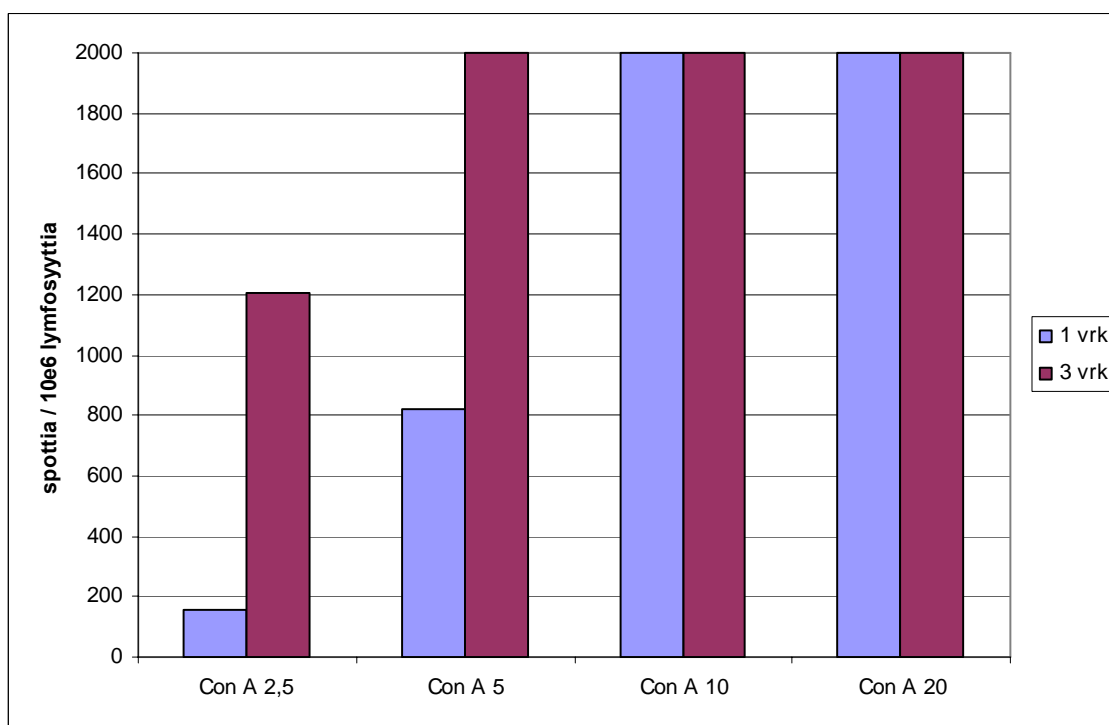
Tuloksista voidaan todeta, että PHA reagoi vahvasti konsentraatiolla 2,5 µg/ml ja tuotti niin paljon spotteja, ettei niitä voitu laskea. Pitoisuuksien 0,63 µg/ml ja 0,31 µg/ml välillä tapahtuu selvä pudotus ja pienemmät pitoisuudet eivät enää tuota juurikaan spotteja. PHA:lle solumäärä 200 000 solua/kuoppa oli myös hieman liikaa.

8.4 Inkubaatioajan vaikutus sytokiinin tuotantoon

Neljäntenä tutkimuskohteena oli selvittää miten pidempi inkubaatioaika vaikuttaa solujen sytokiinin tuotantoon. Tutkimuksessa käytettiin kahden eri henkilön tuoreita soluja, jotka stimuloitiin epäspesifisesti PWM:lla ja Con A:lla. Yhden vuorokauden kuoppalevystä on laskettu molemmista näytteistä rinnakkaisten keskiarvot. Näitä keskiarvoja verrataan kolmen vuorokauden ajan lämpökaapissa olleiden näytteiden tuloksiin. Kuopat, jotka olivat liian tummia tai joissa oli liikaa spotteja laskettavaksi menevät pylväsdiagrammissa diagrammin yläreunaan kiinni (kuvio 8 ja kuvio 9). PWM tuotti kaikilla pitoisuuksilla liikaa spotteja, jotta laite olisi voinut niitä laskea. Tämän vuoksi PWM on jätetty alla olevista kuvaajista kokonaan pois.



KUVIO 8. Henkilön HK5 yhden ja kolmen vuorokauden inkubaatioajan vertailu Con A -mitogeenilla.



KUVIO 9. Henkilön HK6 yhden ja kolmen vuorokauden inkubaatioajan vertailu Con A -mitogeenilla.

Molempien näytteiden kohdalla Con A on konsentraatiolla 2,5 µg/ml antanut spotteja sekä yhden että kolmen vuorokauden inkubaatioajan jälkeen. Seuraavassa pitoisuudessa (5 µg/ml) yhden vuorokauden levy on antanut paljon spotteja, mutta kolmen vuorokauden inkubaatioaika on tehnyt kuopista liian tummia, jotta niitä voisi lukea. Tuloksista

voidaan todeta, että kolmen vuorokauden inkubaatio lämpökaapissa on lisännyt solujen sytokiinin tuotantoa, mutta yhden vuorokauden inkubaatio on antanut riittävästi spotteja. Pidemmän inkubaatioajan vaikutuksesta sytokiinia oli kuopissa niin paljon, että yksittäisiä spotteja ei erottanut. Tämä vaikeuttaa huomattavasti spottien lukemista ja tunnistamista, joten kolmen vuorokauden inkubaatioaika näillä mitogeenipitoisuuksilla ja solumäärillä ei ole käytännöllinen.

9 LUOTETTAVUUS

Arvioin tutkimuksen luotettavuutta tarkastelemalla sen validiteettia eli pätevyyttä ja reliabiliteettia eli tulosten tarkkuutta. Validiteetti kuvaa sitä, miten hyvin tutkimusmenetelmä mittaa juuri sitä mitä oli tarkoitus mitata. Se tarkoittaa systemaattisen virheen puuttumista. Reliabiliteetilla tarkoitetaan kykyä tuottaa tarkkoja ja toistettavia mittaus-tuloksia. Tulokset eivät saa olla sattumanvaraisia. Tulosten sattumanvaraisuutta lisää pieni otoskoko ja mittaus- tai käsittelyvirheet. (Heikkilä 1999: 28–29, 178–179.)

Työni aikana seurasin koko ajan tiiviisti työohjetta ja sain apua ja neuvoa ohjaajiltani aina kun niitä tarvitsin. Jos olin jostain laskuista tai toimenpiteistä epävarma, varmistin asiat ohjaajiltani. Opinnäytetyöni empiirisen osuuden aikana pidin laboratoriossa työpäiväkirjaa, johon kirjasin ylös päivittäiset työvaiheet sekä työmenetelmät. Kirjasin työpäiväkirjaan myös ongelmat, joita olin työvaiheiden aikana kohdannut. Jokaisen testin ja tutkimuksen suoritin aina samalla tavalla, jotta tuloksista tulisi mahdollisimman vertailukelpoisia.

Tuloksiin tulee suhtautua kriittisesti. Kyseessä oli alustava tutkimus ja tulokset olivat vain suuntaa-antavia. Työssä käytetyt näyttemäärät olivat pieniä, mikä osaltaan vähentää tutkimuksen reliabiliteettia. Näin ollen tulokset eivät ole yleistettävissä. Jos halutaan yleistettäviä tuloksia, tulisi näytteitä olla paljon enemmän. Mahdollisuuksien mukaan pyrin tekemään jokaisesta näytteestä rinnakkaismääritykset, jotta tulokset olisivat olleet luotettavia. Jos tutkittavaa näytettä oli vähän, rinnakkaismäärityksiä ei voitu tehdä.

Työni aloitusvaiheessa rinnakkaisissa oli eroja, mikä saattoi johtua ainakin osittain siitä, että minulla oli harjoitusta pipetoinnista ja ELISPOTin teosta vain vähän. Tulosten luo-

tettavuutta olisi voinut parantaa se, että pipetointia olisi voinut harjoitella ennen varsinaista työn suorittamista, jotta siihen olisi saanut varmuutta ja itselle paras tekniikka olisi löytynyt. Työn edistyessä huomasin rinnakkaismääritysten tulosten paranevan, kun sain harjoitusta ja löysin oikeanlaisen tekniikan pipetointiin. ELISPOTin teossa preanalytiikkaan tulee kiinnittää huomiota. Työtä tehdessäni seurasin huolellisesti ohjeita näytteiden ja reagenssien säilytyksestä ja käsittelystä. ELISPOT-menetelmä sisältää paljon aseptisesti suoritettavia työvaiheita, joissa oli oltava tarkkana, jotta kontaminaatiota ei pääse tapahtumaan.

Tulokset analysoitiin Bioreader- ja AID-lukijalaitteilla. Kumpikaan laitteista ei pystynyt lukemaan kunnolla spotteja ja antamaan tarkkaa tulosta kuopista, jotka olivat hyvin tummia tai joissa spotteja oli hyvin paljon. Tällaiset kuopat tarkastettiin joko AID-laitteen väritulosteen avulla tai silmämääräisesti katsomalla kuoppalevyiltä. Liian tummien kuoppien erottaminen oli melko helppoa, sillä ne erottuivat selkeästi kuopista, jotka laitteet pystyivät lukemaan. Kun aloitin työni laboratorio-osuuden, ei AID-laitetta ollut vielä kalibroitu vastaamaan Bioreader-laitetta minkä vuoksi pelkästään sitä ei voitu käyttää.

10 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Opinnäytetyöni tarkoituksena oli primaaristen immuunivajavuustilojen diagnostiikkaan soveltuvan ELISPOT-menetelmän testaaminen ja pystyttäminen. Kyseessä oli alustava tutkimus, jonka tavoitteena oli verrata tuoreiden ja pakastettujen näytteiden antamia ELISPOT-tuloksia ja selvittää voisiko pakastettuja näytteitä käyttää alustavien viitearvojen määrittämiseksi. Tavoitteena oli myös kehittää ELISPOT-menetelmää vertaamalla yhden ja kolmen vuorokauden inkubaatioajan vaikutuksia solujen sytokiinin tuotantoon sekä testaamalla erilaisia mitogeenilaimennoksia optimaalisen mitogeenikonsentraation löytämiseksi.

Henkilökunnan pakastettujen ja tuoreiden näytteiden vertailusta saadut tulokset osoittavat, että pakastetut näytteet eivät vastaa sytokiinin tuotannoltaan tuoreita näytteitä tässä tutkimuksessa. Kun määritettiin alustavia viitearvoja pakastetuista potilasnäytteistä, todettiin, ettei pakastettuja näytteitä voi käyttää menetelmän pystyttämiseen ja viitearvo-

jen määrittämiseen, sillä pakastettujen potilasnäytteiden antamat spottien määrät vaihtelivat paljon. Syytä spottien määrän vaihteluun ei tiedetä. Ehkä pakastamis- tai sulattamisvaiheessa on saattanut tapahtua jotain, mikä vaikuttaa tuloksiin. Vaikutusta voi myös olla sillä, että tutkittavat näytteet eivät olleet perusterveiden ihmisten näytteitä. Jatkossa näytteiden analysointi alustavia viitearvojen määrittämisä varten kannattaisikin tehdä perusterveistä henkilöistä.

Mitogeenien titrauksesta saadut tulokset osoittavat, että Con A:lla optimaalinen ja sub-optimaalinen pitoisuus löytyi niistä mitogeenipitoisuuksista, joita käytettiin pakastettujen ja tuoreiden näytteiden vertailussa. PWM:lle ja PHA:lle käytetty solumäärä (200 000 solua/kuoppa) oli liian suuri ja spotteja tuli liian paljon, jotta niitä olisi voitu lukea. PWM:lle ja PHA:lle sopivampi solumäärä olisi ehkä 30000 solua/kuoppa, jota käytettiin pakastettujen ja tuoreiden näytteiden vertailussa. Erilaisia solumääriä ja mitogeenipitoisuuksia olisi hyödyllistä testata jatkossa vielä lisää, jotta saataisiin selville parhaiten ELISPOT-määrittämiseen soveltuvat solumäärät ja mitogeenien konsentraatiot.

Tutkimus oli mielestäni vaativa, sillä ELISPOT-menetelmä on työläs ja vaatii opettelua. Koska kokemusta ELISPOTin teosta ja pipetoinnista on vähän, rinnakkaisten näytteiden tuloksissa oli eroja ja ne varmasti osaltaan vaihtelivat sen vuoksi. Pipetointitekniikkaan on syytä kiinnittää huomiota ELISPOTin teossa, sillä kuopat kontaminoituvat helposti, jos pipetinkärki osuu niihin. Koska ELISPOT-menetelmä ja solujen eristäminen olivat minulle entuudestaan täysin vieraita, oli tutkimuksen tekeminen mielestäni antoisaa ja mielenkiintoista ja opin paljon uusia asioita.

Tutkimuksesta saadut tulokset ovat alustavia ja vain suuntaa-antavia, mutta osoittavat, että menetelmän pystyttäminen on mahdollista ja lupaavaa. Menetelmässä on kuitenkin vielä paljon kehitettävää. Koska alustavat tulokset olivat lupaavia, tutkimusta primaarisien immuunivajavuustilojen diagnostiikkaan soveltuvan ELISPOT-menetelmän kehittämiseksi on päätetty jatkaa.

LÄHTEET

Arstila, Petteri – Hänninen, Arno 2005: Soluvälitteinen immunitetti. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.)2005: Mikrobiologia ja infektiosairaudet kirja 1. Duodecim. Jyväskylä: Gummerus kirjapaino Oy. 709–711, 713–720, 721–723.

Bucley, Rebecca H. 2002: Primary cellular immunodeficiency. Journal of allergy and clinical immunology 109 (5). 747–755.

Carreiro-Lewandowski, Eileen 2005: Basic principles and practise of clinical chemistry. Teoksessa Bishop, Michael L. – Fody, Edward P. – Schoeff, Larry E. (toim.)2005: Clinical Chemistry. Principles, procedures, correlations. 5. painos. Lippincott Williams & Wilkins.

CEF- Class I Peptide Pool ”Plus” Product Data Sheet 2007: Cellular Technology Ltd. <www.immunospot.com>

Czerkinsky, Cecil C. – Nilsson, Lars-Åke – Nygren, Håkan – Ouchterlony, Örjan – Tarkowski, Andrej 1983: A Solid-Phase Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) Assay for Enumeration of Specific Antibody-Secreting Cells. Journal of Immunological Methods 65. 109–121.

Folds, James D. – Schmitz, John L. 2003: Clinical and laboratory assesment of immunity. Journal of allergy and clinical immunology 111 (2).702–711.

Fowke, Keith R. – Behnke, Jim – Hanson, Carla – Shea, Kathy – Consentino, L. Mark 2000: Apoptosis: a method for evaluating the cryopreservation of whole blood and peripheral mononuclear cells. Journal of immunological methods 244. 139–144.

Heikkilä, Tarja 1999: Tilastollinen tutkimus. 2. painos. Helsinki: OY Edita AB. 28–29, 178–179.

Hay, Frank C. – Westwood, Olwyn M.R. 2002: Practical immunology. 4. painos. Blackwell Publishing company. 277–278.

Julkunen, Ilkka – Silvennoinen, Olli – Hurme, Mikko 2005: Sytokiinit, niiden toiminta ja kliininen merkitys. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.) 2005: Mikrobiologia ja infektiosairaudet kirja 1. Duodecim. Jyväskylä: Gummerus kirjapaino Oy. 735, 738–739.

Kay, John E. 1991: Mechanisms of T lymphocyte activation. Immunology Letters 29. 51–54.

Kreher, Christian R. – Dittrich, Markus T. – Guerkov, Robert – Boehm, Bernhard O. – Tary-Lehmann, Magdalena 2003: CD4⁺ and CD8⁺ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. Journal of Immunological Methods 278. 79–93.

Lääketieteen termit 2002. Nienstedt Walter (päätoim.). 4. painos. Helsinki: Duodecim.

Mabtech Ab 2007: Product catalogue 2007. Verkkodokumentti. <<http://www.mabtech.com/OnlineCatalogue.aspx>> Luettu 13.3.2008.

Mabtech Ab 2008: Menetelmän periaate. Verkkodokumentti. <<http://www.mabtech.com/ELISpot.aspx>>. Luettu 21.1.2008.

Mannering, Stuart I. – Morris, Jessica S. – Jensen, Kent P. – Purcell, Anthony W. – Honeyman, Margo C. – van Endert, Peter M. – Harrison, Leonard C. 2003: A sensitive method for detecting proliferation of rare autoantigen-specific human T-cells. Journal of immunological methods 283. 173–183.

Marshall, William J. 2000: Clinical Chemistry. 4. painos. Harcourt publishers limited. 5-6.

Meri, Seppo 2005: Johdatus immunologiaan. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.)2005: Mikrobiologia ja infektiosairaudet kirja 1. Duodecim. Jyväskylä: Gummerus kirjapaino Oy. 619–620.

Power, Carl A. – Grand, Cory L. – Ismail, Nahed – Peters, Nathan C. – Yurkorwski, Dean P. – Bretscher, Peter A. 1999: A valid ELISPOT assay for enumeration of ex vivo, antigen-specific, IFN γ -producing cells. *Journal of Immunological Methods* 227. 99–107.

Roitt, Ivan – Brostoff, Jonathan – Male, David 2001: *Immunology*. 6. painos. Harcourt publishers limited. 119, 303, 305–307.

Ruuskanen, Olli – Jalanko, Hannu 2005: Primaariset immuunivajavuustilat. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.)2005: Mikrobiologia ja infektiosairaudet kirja 1. Duodecim. Jyväskylä: Gummerus kirjapaino Oy. 797–802.

Räisänen-Sokolowski, Anne 2008. Dosentti. HUSLAB, transplantaatiolaboratorio. Helsinki. Suullinen tiedonanto 31.1.

Schwartz, Gary J. – Diller, Kenneth, R. 1984: Intracellular freezing of human granulocytes. *Cryobiology* 21. 654 – 660.

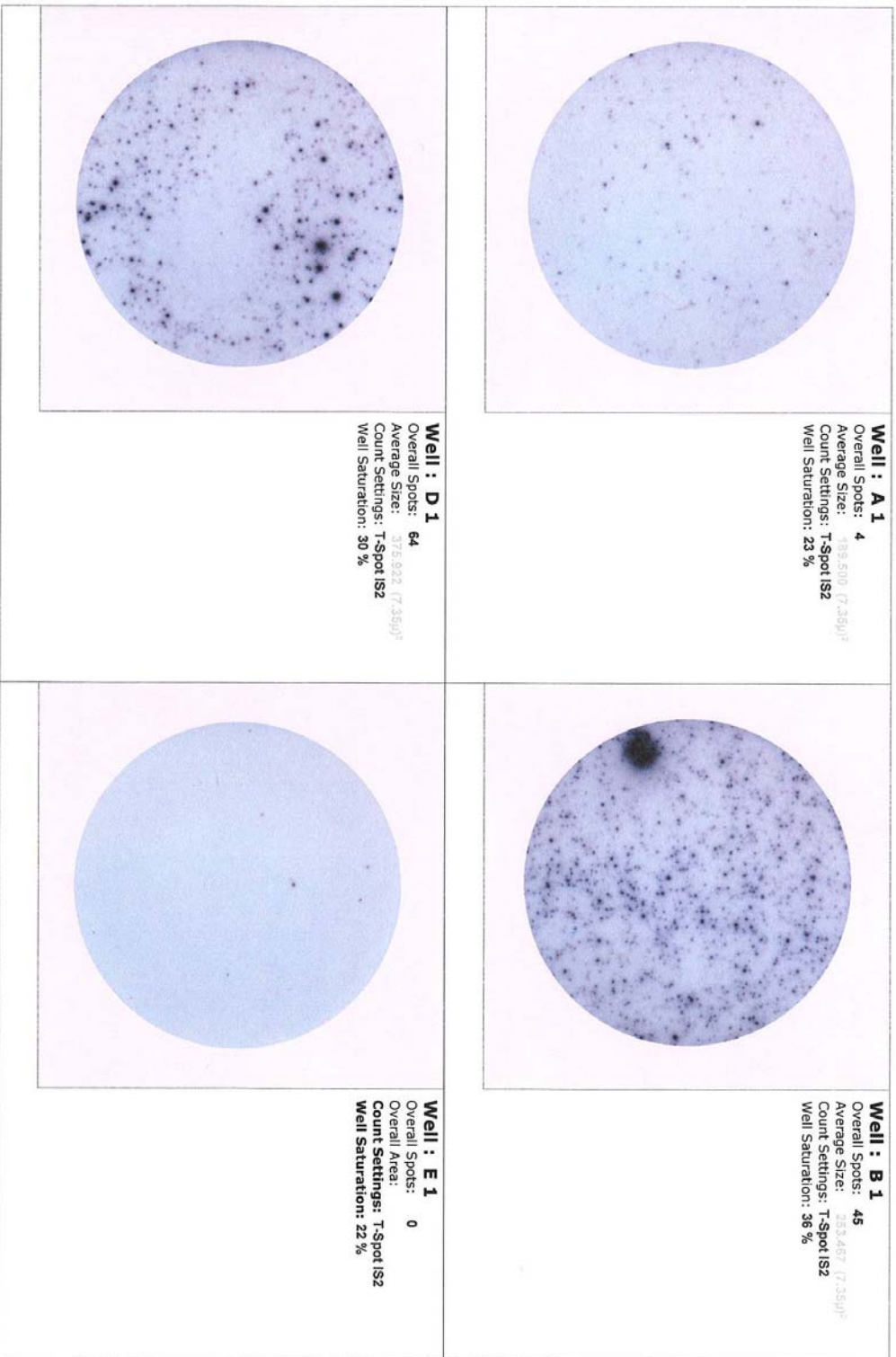
Seppälä, Ilkka J.T. 2005: Vasta-ainevälitteinen immunitetti. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.)2005: Mikrobiologia ja infektiosairaudet kirja 1. Duodecim. Jyväskylä: Gummerus kirjapaino Oy. 699–703.

Seppänen, Mikko – Repo, Heikki 2005: Sekundaariset immuunivajavuustilat. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.)2005: Mikrobiologia ja infektiosairaudet kirja 1. Duodecim. Jyväskylä: Gummerus kirjapaino Oy. 805.

Smith, Jeffrey G. – Joseph, Heather R. – Green, Tina – Field, Jodie A., Wooters, Melissa – Kaufhold, Robin M. – Antonello, Joseph – Caulfield, Michael J. 2007: Establishing acceptance criteria for cell-mediated-immunity assays using frozen peripheral blood mononuclear cells stored under optimal and suboptimal conditions. *Clinical and vaccine immunology* 14 (5). 527–537.

Veren lymfosyyttien stimulaatiotutkimus. 2007. Työohje. HUSLAB. Patologian vastuualue.

Wang, Sheng-Yuan – Hsu, Ming-Ling – Tzeng, Cheng-Hwai – Hsu, Hui-Chi – Ho, Chi-Kuan 1998: The influence of cryopreservation on cytokine production by human T lymphocytes. *Cryobiology* 37. 22–29.



KÄYTETYT REAGENSIT JA LAITTEET

Tarvikkeet ja laitteet

- Laminaarivirtauskaappi: Kojar KR-100 BW
- Sentrifuugi; Megafuge 1.0 R
- + 37°C, 5 % CO₂ inkubaattori; Assab Medicin AB
- Steriilit pipetit ja pipetinkärjet
- Steriilit, polypropyleeni Falcon-sentrifuugiputket (15 ml ja 50 ml)
- ADVIA60-solulaskuri
- Eppendorf-putket 0,5 ml (Sarstedt)
- Vakuumpumppu; Vacusafe comfort

Reagenssit

- Steriili RPMI 1640
- 10x CTLW-010 Wash supplement, CTL
- Steriili 200mM glutamiini
- Steriili penisilliini-streptomysiini (Pen-Strep)
- Soluviljelyliuos: CTL test-media, CTL
- 80 % alkoholi tai vastaava desinfiointiliuos
- PBS pH 7,2–7,4
- CEF-peptidi; CTL-CEF-Peptide Pool Plus. Lopullinen konsentraatio kuopassa 2µg/ml.
- Phytohemagglutiniini (PHA), lopulliset konsentraatiot 10 ja 2,5 µg/ml. SIGMA
- Pokeweed mitogen (PWM), lopullinen konsentraatio 2,5 µg/ml. SIGMA
- Concanavalin A (Con A), lopulliset konsentraatiot 5 ja 2,5 µg/ml. SIGMA

IFN- γ ELISPOT kitti (Mabtech)

- Hiiren monoklonalisella IFN- γ -vasta-aineella päällystetty filtteripohjainen kuoppalevy
- Konjugaatti ja Steptavidin-ALP
- BCIP/NBT-substraatti
- CD3-monoklonaalinen vasta-aine

Guidelines for Human IFN- γ ELISpot^{PLUS}

A Preparation and blocking of precoated plate (*sterile conditions*)

1. Assemble the required number of strips in the extra plate frame and wash 4 times with sterile PBS (200 μ l/well). Seal the bag with the remaining strips and store at room temperature.
2. Block with medium containing 10% of the same serum as used for the cell suspensions (200 μ l/well). Incubate for ≥ 30 minutes at room temperature.

B Incubation of cells in plate (*sterile conditions*)

1. Remove the medium and add the cell suspension including possible stimulatory agents such as antigen (final volume 100-150 μ l/well). The mAb CD3-2, included in the kit, is recommended as a positive control for cytokine production using a final concentration of 100 ng/ml.
2. Put the plate in a 37°C humidified incubator with 5% CO₂ and incubate for 12-48 hours. Do not move the plate during this time and wrap the plate in aluminium foil to avoid evaporation.

C Detection of spots

1. Remove the cells by emptying the plate and wash 5 times with PBS, 200 μ l/well.
 2. Dilute the detection antibody (7-B6-1-biotin) to 1 μ g/ml in PBS containing 0.5% fetal calf serum (PBS-0.5% FCS). Add 100 μ l/well and incubate for 2 hours at room temperature.
 3. Wash plate as above (step C1).
 4. Dilute the Streptavidin-ALP (1:1000) in PBS-0.5% FCS and add 100 μ l/well. Incubate for 1 hour at room temperature.
 5. Wash plate as above (step C1).
 6. Filter the ready-to-use substrate solution (BCIP/NBT-plus) through a 0.45 μ m filter and add 100 μ l/well. Develop until distinct spots emerge.
 7. Stop colour development by washing extensively in tap water. Remove the underdrain (the soft plastic under the plate) and rinse the back of the membrane.
 8. Leave the plate to dry. Inspect and count spots in a dissection microscope (x40) or in an ELISpot reader.
 9. Store plate in the dark at room temperature.
-

Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri
HUSLAB

1(2)

TUTKIMUSLUPA-ANOMUS OPINNÄYTETYÖTÄ VARTEN

I PERUSTIEDOT

Opinnäytetyön nimi (nimehdotus): Primaarisen immuunipuutostilan diagnosoiminen ELISPOT -menetelmällä

Opinnäyte: AMK opinnäytetyö ☒ pro gradu ☐ muu, mikä ☐

Opinnäytetyöntekijä(t), puh., e-mail, osoite:
Kati Ruismäki, Kati.ruismaki@edu.stadia.fi, Väinöki Stoolin katu
12b A 20, 00100 Helsinki, 7.0408216303

Allekirjoitus, pvm: 4.1.2008 Kati P Q

Oppilaitos/korkeakoulu/tutkimuslaitos:
Helsingin ammattikorkeakoulu Stadia, Sosiaali- ja terveystieteiden

Ohjaaja (1) oppilaitoksessa/korkeakoulussa /tutkimuslaitoksessa:
Nimi Reeta Lumme Pvm: 7.1.2007
Allekirjoitus: Reeta Lumme Oppiarvo, ammatti Yliopettaja
Puh. 31081232 e-mail: Reeta.Lumme@stadia.fi

Ohjaaja (2) oppilaitoksessa/korkeakoulussa /tutkimuslaitoksessa:
Nimi Annika Rautio Pvm: 7.1.2007
Allekirjoitus: Annika Rautio Oppiarvo, ammatti Lectori
Puh. 31081237 e-mail: annika.rautio@stadia.fi

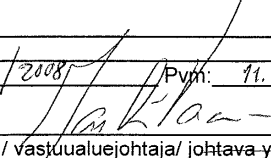
Ohjaaja (1) laboratoriossa:
Nimi Tamara Tuominen Pvm: 4.1.2008
Allekirjoitus: Tamara Oppiarvo, ammatti laborantti
Puh. 0504271044 e-mail: Tamara.Tuominen@Helsinki.fi

Ohjaaja (2) laboratoriossa:
Nimi Enka Karling Pvm: 4.1.2008
Allekirjoitus: Enka Karling Oppiarvo, ammatti laborantti
Puh. 0504279283 e-mail: Enka.Karling@hus.fi

II TUTKIMUSSUUNNITELMA, LAAJEMPI YHTEENVETO SIVULLE 2.

Tutkimus tehdään HUSLABin immunologian osastolle. Työn tarkoituksena on selvittää voidaanko ELISPOT -menetelmää käyttää primaari-immuunipuutos tilanteissa. Työn tavoitteena on terveyden potilasnäytteiden määrittäminen niin, että tulokseksi saadaan raja-arvot. Lisäksi tarkastelen tutkimuksessani sitä toimivatko pakastetut näytteet samalla tavalla eli vaikuttaako solujen pakastaminen tuloksiin.

ELISPOT -menetelmällä tutkin millainen osuus näytteen monoklonalisista soluista tuottaa antigenillä stimuloituna interferoni- γ -gammaa (IFN- γ).

III LABORATORION OSUUS	2(2)
Eettisen toimikunnan käsittely: Tarvitaan _____ Ei tarvita <u> x </u>	
Muu lupa, mikä: _____	
Laboratorion edustajan suostumus: Kyllä _____ Tarvitaan korjaukset _____ Ei suostumusta _____	
Pvm: _____	
Korjattavaa: _____	
Päätösnumero: <u>1/2008</u>	Pvm: <u>11.1.2008</u>
 MARTTI VAARA VASTUUALUEJOHTAJA	
Toimialajohtaja / Vastuualuejohtaja / johtava ylihoitaja/ ylihoitaja	
II TUTKIMUSSUUNNITELMA, yhteenveto:	
Tutkimusongelma, tutkimuksen tavoitteet, merkitys laboratorion kannalta: - Tavoitteena kehittää immuunopatian perustuva diagnostinen menetelmä primaarseen immuunipuutoksen diagnostiikkaan. - Viitearvojen määrittäminen - Voidaisiako pakastettuja näytteitä käyttää viitearvojen määrittämisessä. Pakastettujen ja tuoreiden näytteiden vertailu.	
Aineiston keruu ja käsittely (mahdollinen kyselylomake liitteeksi): - solujen pakastamisen vaikutusten selvittäminen: 3 näytettä henkilökunnasta (tuore ja pakastus) - viitearvojen selvittäminen: n.30 aikuisten näytettä ja n.20 lasten. näytteet immunologian osastolta, valmiiksi kerättyjä ja pakastettuja - Tuloksista histogrammit Kustannusarvio (liite tarvittaessa): Työ tehdään immunologian laboratoriossa, immunologian osaston laitteilla ja reagensseilla.	
Tutkimuksen aikataulu: Laboratoriossa työskentely tapahtuu noin ajalla 21.1. - 24.2.2008, yhteensä 5 viikkoa. Työskentelen 4 päivänä viikossa. Tulosten analysointi ja tulkinta helmi-maaliskuun aikana. Valmiin työn jättäminen 14.4 mennessä Työn esittäminen immunologian osastolla huhti-toukokuussa.	